



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VLIV HYALURONANU NA VLASTNOSTI OČNÍCH KAPEK

EFFECTS OF HYALURONAN ON PROPERTIES OF EYE DROPS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Kateřina Chromá

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1270/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Kateřina Chromá**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.**

Název diplomové práce:

Vliv hyaluronanu na vlastnosti očních kapek

Zadání diplomové práce:

Seznámit se s fyzikálně–chemickými vlastnostmi vybraných očních kapek a jejich složením, související problematikou mukoadheze. Seznámit se se základy interakcí hyaluronanu a opačně nabitých tenzidů.. Navrhnout způsoby a experimenty modifikace vybraných očních kapek přídatkem hyaluronanu a stanovit základní fyzikálně–chemické vlastnosti výsledného systému.

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Kateřina Chromá
student(ka)

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Modifikace očních kapek pomocí hyaluronanu vede ke zvýšení času zadržky na očním povrchu. V této práci byly dlouhodobě sledovány systémy očních kapek Ophthalmo-Septonex a Visine Classic s různými přídávky hyaluronanu z hlediska stability systému. Následně proběhlo zkoumání interakcí hyaluronanu s očními kapkami a s jejími složkami – benzalkoniem chloridem a tetrazolinem pomocí sledování velikostí částic a náboje molekul v čase. U vybraných systémů proběhlo reologické testování a stanovení mukoadhezivního indexu pomocí mucinové metody.

ABSTRACT

Modifying eye drops using hyaluronan leads to an increased retention time on the eye surface. Long-lasting observations of the stability of two different eye drops, Ophthalmo-Septonex and Visine Classic, after the addition of hyaluronan with varying concentration are presented in this work. The interactions of hyaluronan with the eye drops, or their components benzalkonium chloride and tetrazoline, are investigated by monitoring particle sizes and the charge of the molecules. Additionally, rheological examinations of the samples are done and the mucoadhesion index is determined by using the mucine method.

KLÍČOVÁ SLOVA

Oční kapky, Ophthalmo-Septonex, VISINE, tetrazolin, benzalkonium chlorid, zeta potenciál, velikost částic, viskozita, mukoadhezita

KEY WORDS

Eye drops, Ophthalmo-Septonex, VISINE, tetrazoline, benzalkonium chloride, zeta potential, size of particles, viscosity, mucoadhesion

CHROMÁ, Kateřina. *Vliv hyaluronanu na vlastnosti očních kapek* [online]. Brno, 2019 [cit. 2019-05-10]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/117894>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Miloslav Pekař.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce panu profesorovi Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc. za odborné vedení a cenné připomínky. Dále velký dík patří Ing. Jiřímu Smilkovi, Ph.D. a Ing. Michalovi Kalinovi, Ph.D. za vstřícnost, pomoc a ochotu při vypracování experimentální části diplomové práce. Ráda bych také poděkovala mé rodině a blízkému okolí za podporu a pochopení v průběhu celého studia.

OBSAH

ABSTRAKT.....	1
1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1 Oční povrch	8
2.1.1 Rohovka	8
2.1.2 Spojivka.....	9
2.1.3 Slzná žláza.....	9
2.1.4 Slzný film	9
2.1.5 Pohárková buňka	9
2.1.6 Mucin	10
2.2 Kyselina hyaluronová	12
2.2.1 Kyselina hyaluronová v přítomnosti kvartérních solí	13
2.3 Oční kapky.....	13
2.3.1 Oční kapky VISINE	13
2.3.2 Oční kapky OPTHALMO-SEPTONEX	15
2.4 Bioadheze	15
2.4.1 Mukoadheze	16
2.4.2 Mukoadhezivní polymery	16
2.4.3 Faktory ovlivňující vznik adhezivní vazby	16
2.4.4 Metody testování bioadheze.....	16
2.5 Využití nanočástic v kapkách	20
2.5.1 Nanočástice s DNA	20
2.5.2 Nanočástice HyA-CSO	20
2.6 Buněčná absorpce	21
2.6.1 Mechanismus interakce	21
2.6.2 Degradace NP.....	22
3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	23
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	27
4.1 Použité chemikálie.....	27
4.2 Příprava zásobních roztoků	28
4.2.1 Příprava roztoku hyaluronanu HyA _a a HyA _b	28

4.2.2	Příprava modelových očních kapek Septonex	28
4.2.3	Příprava boritého roztoku.....	28
4.3	Příprava vzorků.....	28
4.3.1	Příprava systémů s tetryzolinem	28
4.3.2	Příprava systémů s benzalkonium chloridem.....	28
4.3.3	Příprava systémů s očními kapkami VISINE či Ophthalmo-Septonex.....	29
4.3.4	Příprava systémů pro reologické testování.....	29
4.4	POUŽITÉ METODY	29
4.4.1	Měření velikosti.....	29
4.4.2	Měření zeta potenciálu	29
4.4.3	Měření viskozity.....	30
4.4.4	Mucinová metoda.....	31
5	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	32
5.1	Vizuální sledování	32
5.1.1	Sledování systému VIS+HyA	32
5.1.2	Sledování modelových kapek Septonex+HyA.....	33
5.1.3	Výpočet koncentrace roztoků.....	34
5.1.4	Výpočet procentuální koncentrace roztoků.....	34
5.2	Zkoumání kationtových složek očních kapek	35
5.2.1	Vizuální sledování s tetryzolinem	35
5.2.2	Vizuální sledování s benzalkonium chloridem	36
5.3	Měření zeta potenciálu.....	38
5.4	Měření velikosti částic.....	40
5.4.1	Boritý roztok s HyA _a	41
5.4.2	Roztok tetryzolinu s HyA _a	42
5.4.3	Roztok benzalkonia chloridu s HyA _a	44
5.4.4	Oční kapky VISINE s HyA _a	45
5.4.5	Oční kapky Ophthalmo–Septonex s HyA _a	47
5.4.6	Boritý roztok s HyA _b	48
5.4.7	Roztok tetryzolinu s HyA _b	50
5.4.8	Roztok benzalkonia chloridu s HyA _b	52
5.4.9	Oční kapky VISINE a HyA _b	53
5.4.10	Oční kapky Ophthalmo–Septonex s HyA _b	55

5.4.11	Závěr DLS	56
5.5	Dlouhodobé sledování vybraných systémů	57
5.6	Reologické měření – mucinová metoda	59
5.6.1	Výpočet mukoadhezity pro oční kapky Ophthalmo-Septonex	61
6	ZÁVĚR.....	63
	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	64
	SEZNAM OBRÁZKŮ	69
	SEZNAM TABULEK.....	70
	SEZNAM ZKRATEK.....	71

1 ÚVOD

Lidské oko je velmi citlivý orgán, díky jehož funkci dostáváme obraz o prostředí, které nás obklopuje. Oko, na rozdíl od ostatních orgánů, není chráněno před vnějším prostředím, tak jako další lidské orgány. Proto má své vlastní obranné mechanismy a bariéry proti mnoha vnějším vlivům. Oko se nachází v kostěné oční dutině a je kryto víčky. Oční bulva je pokryta zvlhčujícím slzným filmem, který se podílí nejen na hydrataci, ale i na ochraně proti infekcím. Je to tedy slzný film, který přichází do kontaktu nejen s nečistotami vnějšího prostředí, ale i s očními přípravky. V poslední době stále přibývá případů se „syndromem suchého oka“ či lehkým zanícením, což bývá důsledkem užívání klimatizace nebo dlouhodobého a strnulého „zírání“ do osvětlených obrazovek. Z důvodu sníženého mrkání poté dochází k vysychání či porušení slzného očního filmu. „Syndrom suchého oka“ se může vyskytovat také jako vedlejší účinek mnoha léků, např. hormonální antikoncepce u žen nebo antihistaminik. Oční přípravky, zejména oční kapky jsou přípravky, které díky krátké době setrvání na očním povrchu, vykazují poměrně nízkou účinnost a nutnost časté aplikace. V diplomové práci, která je pokračováním bakalářské práce, se zaměřuji na sledování interakcí očních kapek VISINE a Ophthmo-Septonex s tělu vlastním hyaluronanem. V ideálním případě by díky přítomnosti opačně nabitých řetězců mělo docházet k interakci řetězců a následnému zvýšení viskozity a zlepšení mukoadhezitních vlastností. Sledování interakcí bylo pozorováno metodou dynamického rozptylu světla. Pro stanovení mukoadhezity bylo využito reometrického měření. Zvýšení mukoadhezity by mělo účinek na prodloužení doby setrvání očního přípravku na očním povrchu, což by také poskytovalo výhodu snížené četnosti aplikace a snížení výskytu nežádoucích účinků.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Oční povrch

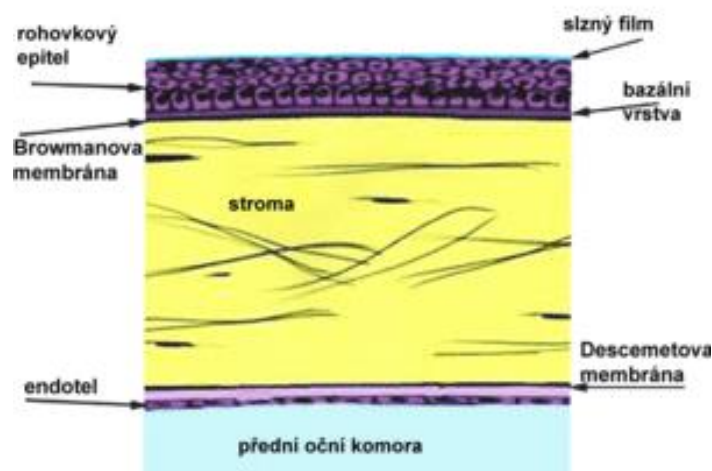
Lidské oko je tvořeno oční bulvou a představuje vysoce specializovaný orgán. Díky němu rozlišujeme barvy a vnímáme rozdílné intenzity světla, tzn. poskytuje nám vizuální představu o okolním světě. Oční bulva se nachází v obličejové oblasti lebky, tzv. očníci. Ze zadní části očníce vystupuje zrakový nerv a vstupuje tepna. Tím je zajištěna jak inervace, tak krevní zásoba oka. Stěna oční bulvy je rozdělena do tří vrstev:

- vnější povrchová vrstva, která se dělí na bělimu a rohovku,
- střední cévnatá vrstva, do které patří cévnatka, řasnaté tělísko, duhovka a
- vnitřní vrstva, která je tvořena světločivnou sítnicí.

V mé práci se budu detailně zabývat očními kapkami, proto je potřeba lépe popsat rohovku a spojivku, které jsou v kontaktu s očními kapkami.

2.1.1 Rohovka

Rohovka (cornea) je leská, průhledná, zakřivená blanka, která je silná přibližně půl milimetru. Nachází se na přední straně oční bulvy a vykazuje vysokou optickou mohutnost. Blanka není cévně zásobena, ale je velmi silně inervována. Rohovka je složena z pěti vrstev. Při pohledu z vnějšku můžeme rozlišit epitel, Bowmanovu membránu, stroma, Descemetovu membránu a endotel, pod kterým se již nachází oční komora.



Obrázek 1: Řez rohovkou [68]

Přední epitel rohovky je vícevrstvý a dlaždicový. Skládá se z 5–6 vrstev buněk. Vnější vrstva je pokryta mikrokly a tlustou ochrannou vrstvou, tvořenou převážně lipidy a glykoproteiny. Pod touto vrstvou se nachází Bowmanova membrána, která je tvořena kolagenními vlákny. Tato membrána přispívá ke stabilitě a odolnosti rohovky. Membrána přechází do další vrstvy tvořené svazky kolagenních fibril, mezi které pronikají fibroblasty. Descemetova membrána

má charakter bázální laminy. Pod touto membránou se nachází plochý zadní epitel rohovky, který se podílí na syntéze Descemetovi membrány.

2.1.2 Spojivka

Spojivka (unicajunctiva) bývá zařazována mezi přídavné orgány oka. Je to sytě růžová slizniční blána, která pokrývá vnitřní stěnu víčka a ohybem přechází na oční kouli. Zepředu kryje bělimu až po okraj rohovky. Velmi často bývá postižena záněty, jelikož se nachází v přímém kontaktu s vnějším prostředím. Její funkcí je ochrana a zajištění hladkého pohybu víček přes bulvu a sekrece hleny, který je součástí slzného filmu [17, 18].

2.1.3 Slzná žláza

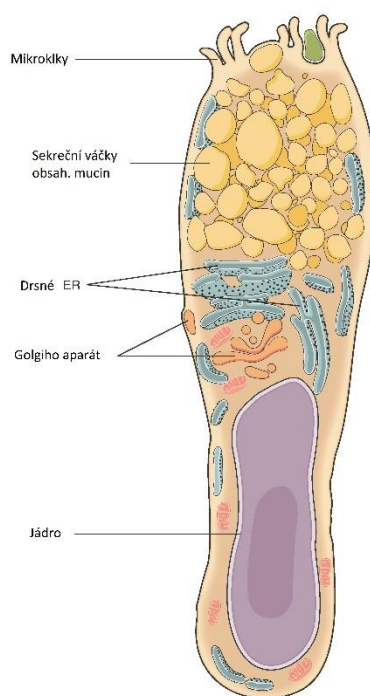
Slzná žláza (glandula lacrimalis) je uložena nad oční koulí. Otevírá se větším počtem vývodů do spojivkového vaku, který je tvořen prostorem mezi spojivkou a víčkem. Její činností dochází k tvorbě slz (lacrimae), které obsahují zejména chlorid sodný, lysozym a mucin. Funkcí slz je vymývat nečistoty, zvlhčovat přední stěnu oka a chránit ho před infekcí. Slzy následně odtékají do slzného vaku vnitřní stranou oka a dále slzovodem do dutiny nosní.

2.1.4 Slzný film

Slzný film je tenká vrstva chránící rohovku a spojivku před vysycháním, infekcí a díky vyhlazení očního povrchu umožňuje vznik ostrého obrazu. Podílí se také na výživě a okysličení rohovky. Slzný film se vytváří a je udržován mrkáním. Díky velkému povrchovému napětí brání rychlému odtékání vodné složky slz a vysychání očního povrchu. Slzy zajišťují odplavení odloučených buněk, bakterií a nečistot. Slzný film je tvořen třemi vrstvami. Vnitřní hlenová vrstva je tvořena zejména mucinem, který se tvoří v pohárkových buňkách epitelu. Střední neboli vodná vrstva obsahuje proteiny a elektrolyty ve vodě. Tato vrstva je tvořena v slzných žlázách a buňkách epitelu. Vnější vrstva obsahuje lipidy tvořené Meibomskými žlázkami a její funkcí je zpomalit odpařování vody z očního povrchu.

2.1.5 Pohárková buňka

Pohárková buňka je žlázová epiteliální buňka, která se nachází volně roztroušená v krycím epitelu orgánů dýchacího a zažívacího traktu, ale i spojivky. Buňka je podlouhlého „pohárkového“ tvaru. Její apikální strana je nafouklá velkým množstvím mucinogenních zrn, zatím co její bazální strana je výrazně užší a obsahuje buněčné organely jako je jádro, endoplazmatické retikulum, mitochondrie apod. Apikální strana buňky je pro zvýšení plochy sekrece z vnější strany poseta mikrokly. Buňka využívá bazální sekrece, což je základní úroveň nezávislá na stimulech. Bazální sekrece je způsobena pohybem sekrečních granulí. Zvýšené sekrece může být dosaženo stimuly z vnějšího prostředí, jako je prach, kouř, bakterie nebo viry.



Obrázek 2: Pohárková buňka 19

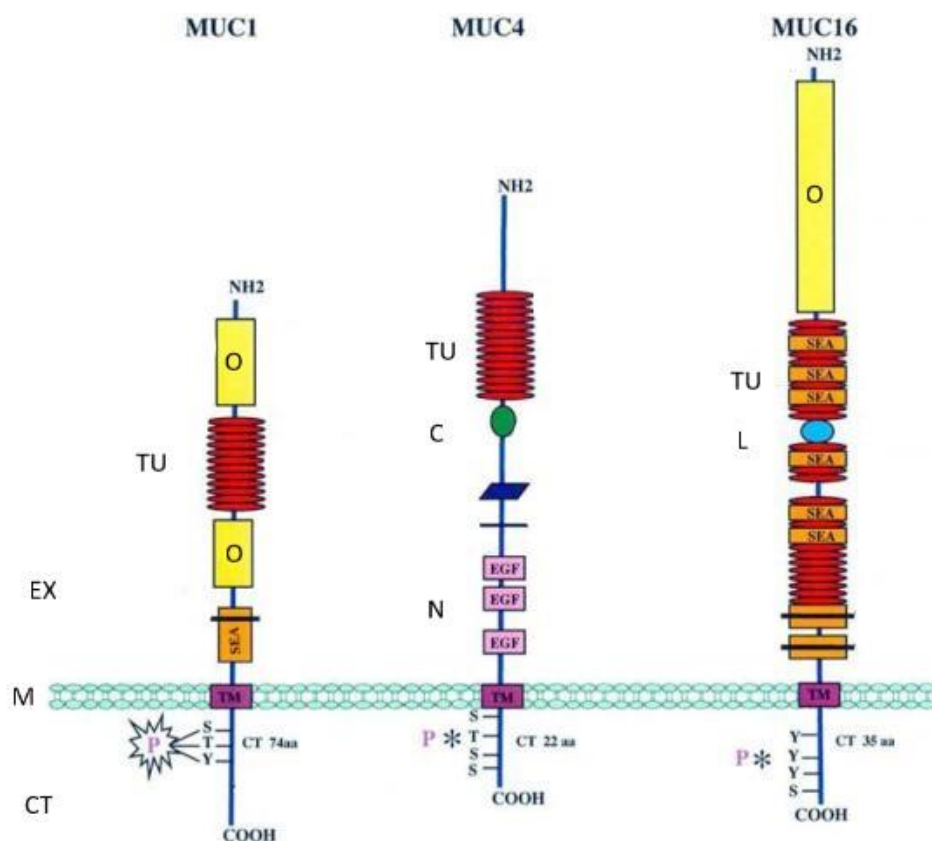
2.1.6 Mucin

Mucin je označení pro rozsáhlou skupinu bílkovin, přesněji glykoproteinů, tvořících na sliznici mucus neboli hlen. S mucinem se můžeme setkat na všech površích sliznic, kde tvoří vrstvu tlustou okolo 1 μ m. Jeho přítomnost je velmi důležitá také v slzách. Na očním povrchu je produkován spojivkovými pohárkovitými buňkami. Mucin je součástí cytoplazmatické membrány a extracelulární matrix. Páteř mucinového řetězce je tvořena proteinem bohatým na serinové a threoninové oblasti. Boční řetězce jsou tvořeny oligosacharidy, které jsou vázané přes kyslík a tvoří až 70 % hmotnosti řetězce. Můžeme rozlišit přes 20 typů mucinu. Mucin může být buď membránově vázaný (typy MUC 1, 4, 15, 16, 20) nebo volný v slzách, (MUC 5) tvořící či netvořící gel. Hlavní funkce mucinu je zvlhčovat a vyhlazovat oční povrch. Při výskytu cizích částic mucin zajišťuje jejich zapouzdření a odstranění z očního povrchu slzami.

2.1.6.1 Mebránově vázaný mucin

Jako membránově vázaný mucin se označuje mucin, který je přidržován dlouhými řetězovitými molekulami vrstvy zvané glykokalyx. Glykokalyx je tvořen řetězci vmezeřenými mezi epitelové buňky na povrchu rohovky. Na řetězce této vrstvy adhezuje mucin, a tím se původně hydrofobní povrch rohovky stává hydrofilním, což je nezbytné pro udržení vlhkosti na očním povrchu. Poškozením vrstvy glykokalyxu či mucinu by došlo k nedostatku vody na očním povrchu. Obrázek 3 znázorňuje membránově vázané typy mucinů. Každý řetězec obsahuje doménu pro cytoplazmatickou membránu (CT), hydrofobní membránu (M) a extracelulární doménu (EX). Tato doména je složena z tandemově se opakujících oblastí bohatých na serinové a threoninové zbytky (TU). Tyto zbytky jsou místem pro glykosilaci (N

označení pro N-glykosilaci, O označení pro O-glykosilaci). Doména C vyznačuje místo s vysokým výskytem cysteinu, L označuje místo výskytu leucinových prstů. Díky tomu tvoří tyto typy mucinů síť vázanou na membránu. Vázané muciny jsou složeny ze dvou heterodimerů. Větší heterodimer je kompletně extracelulární a je silně glykosilován. Menší heterodimer je složen z transmembránové domény a krátkého cytoplazmatického ocásku.



Obrázek 3: Schématické zobrazení typů membránově vázaných mucinů [20]

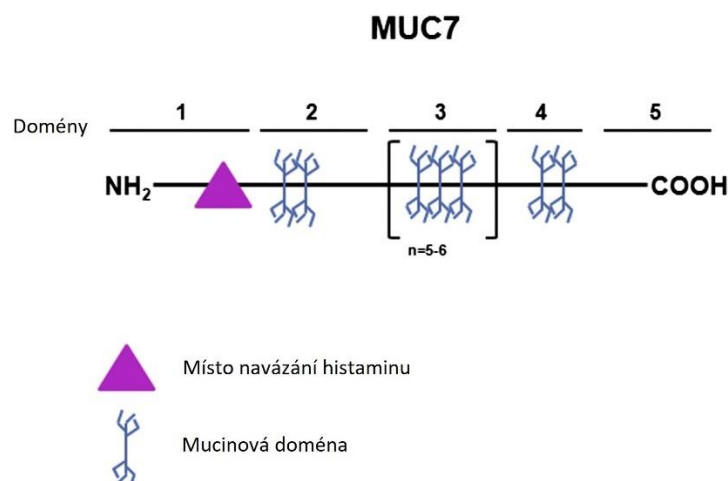
Syntéza mucinu probíhá v drsném endoplazmatickém retikulu, kde se syntetizuje prekurzor polypeptidu. Ten se štěpí na dva fragmenty, které následně tvoří dva heterodimery. Regulace produkce mucinu probíhá na 4 úrovních: transkripce, translace mRNA do proteinu, buněčného dělení nebo posttranslačních mechanismů, mezi které patří glykosylace tandemových oblastí.

Hlavní funkcí membránově vázaného mucinu v slzách je ochrana očního povrchu. Glykany membránově vázaného mucinu poskytují tuhou síť, díky čemuž vrstva slzného filmu může být rozšířena až na 500μm nad oční povrch. Jelikož o-glykany jsou hydrofilní, zajišťují hydrataci očního povrchu. Mají anti-adhezivní vlastnosti proti bakteriím a virům, čímž poskytují mechanickou bariéru očního povrchu. MUC 1 a 16 je schopen vázat galektin-3 na povrchu rohovky a spojivky [20], čímž přispívá k zesíťování zbytků glykanů do mřížky. V případě nízké glykosylace mucinu či nedostatku galaktinu-3 dochází ke zvýšení epiteliální permeability. Tím je snížena ochrana oka před viry a bakteriemi. Mucin vykazuje také

signalizační mechanismy. Při výskytu bakterie dojde ke spuštění fosforylace a následné translokaci cytoplazmatického ocásku do jádra, čím je zajištěna aktivace transkripce.

2.1.6.2 Sekreční mucin

Tuto skupinu mucinů můžeme rozdělit na muciny tvořící či netvořící gel. Sekreční mucin se vyskytuje rozpuštěný ve vodě. Mezi sekreční muciny patří MUC 7, což je malý monomer o molekulové hmotnosti 180kDa [20]. Obrázek 4 zobrazuje náčrtek struktury sekrečních mucinů. Jedná se o polypeptidové řetězce s 5 funkčními doménami. První doména je terminální s leucinovými prsty a obsahuje místo pro interakci s histaminem, který působí jako mediátor zánětu. Tímto způsobem dochází k regulaci produkce mucinu. Doména 2 je mírně glykosylována. Třetí doména se skládá z 6 silně glykosylováných tandemově se opakujících jednotek. Doména 4 je silně glykosylována. Pátá doména je terminální, obsahující leucinové prsty a C-konec. MUC 7 obsahuje velké množství prolinu, který tvoří polyprolinovou strukturu. Syntézu zajišťuje slzná žláza nebo spojivka. Hlavní funkcí sekrečního mucinu v slzách je zabránit navázání patogenů nebo jejich kolonizaci, a to díky maskování povrchových adhezínů.



Obrázek 4: Schéma sekrečního mucinu 20

Muciny tvořící gel jsou obrovské glykoproteiny obsahující velké množství cysteinu. Molekuly cysteinu mezi sebou tvoří disulfidické můstky, které zajišťují síťování do gelové podoby. Muciny tvořící gelové struktury jsou důležité zejména jako bariéra proti patogenům. Existuje hypotéza, že tento typ mucinů zachycuje patogeny a s pomocí mrknutí je odvádí do nosní dutiny.

2.2 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová se řadí mezi lineární biopolymery. Vyskytuje se jako sodná sůl tvořící gelovitou spojovací hmotu s vysokou viskozitou a elasticitou. Je součástí většiny pojivových, epitelových a nervových tkání. Velké množství kyseliny hyaluronové obsahuje také sklivec, kůže nebo nádorové buňky. Její molekula je tvořena opakujícími se jednotkami kyseliny D-glukuronové a N-acetylglukosaminu spojenými střídavě se opakujícími

glykosidickými vazbami β (1,4) a β (1,3). Hyaluronový řetězec se skládá z části hydrofobní, tvořenou axiálními vodíky, zatímco opačný řetězec tvoří hydrofilní část. Díky tomuto uspořádání dochází k vytvoření spirálové konfigurace, která je velmi stabilní a vyznačuje se schopností pojmout až tisícinásobné množství vody 40. Tento tělu vlastní polysacharid má schopnost bránit prostupu virů přes matrix k buňce. Interakce mezi hyaluronovým receptorem CD44 a extracelulárním polysacharidem je spojena s pohybem a migrací buněk 41.

2.2.1 Kyselina hyaluronová v přítomnosti kvartérních solí

Prostorová konformace polysacharidového řetězce ve vodném prostředí je dána zejména vodíkovými vazbami mezi vodou a polysacharidem. Při zvýšené koncentraci HyA ve vodném prostředí musí být zvažovány také intermolekulární a intramolekulární vazby. Kyselina hyaluronová má amfifilní charakter, kdy hydrofilní části se nachází v postranních řetězcích a hydrofobní domény v „kostře“ polysacharidu. V roztocích s velmi nízkou koncentrací vysokomolekulárního hyaluronanu lze předpokládat, že HyA řetězce budou agregovat nebo tvořit duplex, a to díky vazbám mezi hydrofobními řetězci [34].

Grundělová L. a spol. (2013) zkoumali konformaci HyA v závislosti na rostoucí koncentraci benzalkonia chloridu (BAK). V jejich práci popsali hypotézu, ve které došli k závěru, že při nízké koncentraci BAK dochází k nábojovému přitahování opačně nabitých konců kladně nabitého BAK a záporně nabitého řetězce HyA. Tento proces probíhá, dokud nejsou všechna místa na HyA řetězci obsazena. Při zvýšení koncentrace nad kritickou micelární koncentraci dochází k tvorbě micel, na které se navazují molekuly BAK, což má za následek smrštění řetězce. S dalším zvýšením koncentrace BAK dochází k postupnému roztahování komplexů díky interakcím mezi hydrofilními doménami. Tento proces probíhá až do překročení druhé kritické micelární koncentrace, kdy můžeme sledovat tvorbu II. typu micel a zmenšení průměru molekuly.

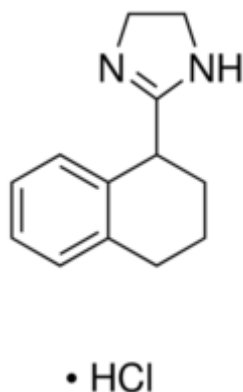
2.3 Oční kapky

Pro léčbu poškození nebo zanícení oka se využívá různých léčivých přípravků. Jelikož oko je velmi senzitivní orgán, musí mít přípravek striktně dané vlastnosti. Mezi hlavní patří nižší hodnota osmotického tlaku, než je tlak slzní tekutiny, pH roztoku okolo 7,4 a mikrobiální čistota přípravku musí být taková, aby nedocházelo ke dráždění očního povrchu. Dalšími sledovanými vlastnostmi je povrchové napětí, viskozita a koncentrace roztoku. Pro moji práci jsme vybrali oční kapky Ophthalmo-Septonex a VISINE Classic.

2.3.1 Oční kapky VISINE

Visine Classic jsou běžně dostupné oční kapky, které se používají při překrvení či otoku spojivek vyvolaných vnějšími vlivy nebo alergickými zánětlivými onemocněními. Mezi nejčastější dráždivé vlivy patří kouř, prach, vítr, ostrý předmět. Přípravek je užíván k odstranění obtíží, tj. ke zmírnění pálení, svědění, bolesti nebo nadměrného slzení [1]. Obvyklá dávka pro dospělé a děti od 2let je jedna kapka 2–3krát denně [1]. K ústupu obtíží by mělo dojít do 48 hodin, jinak je nutné vyhledat lékaře. Užívání přípravku Visine Classic by nemělo

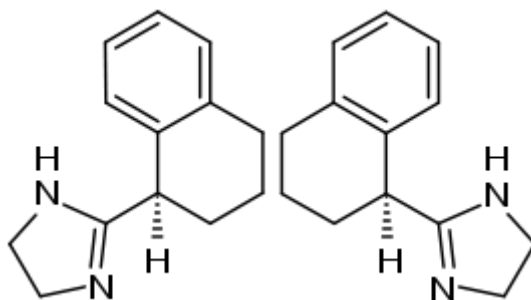
být delší než 5dní bez konzultace s lékařem. Léčivou látkou je tetryzolin-hydrochlorid v koncentraci 0,5 mg v 1 ml, kdy 1 ml obsahuje 20 kapek [1]. Pomocnými látkami jsou kyselina boritá, dekahydrát tetraboritanu sodného, chlorid sodný, dihydrát dinatrium-edetátu, roztok benzalkonium-chloridu a čištěná voda [1].



Obrázek 5: Vzorec tetryzolin-hydrochlorid [3]

2.3.1.1 Tetryzolin

Tetryzolin neboli tetryzolin hydrochlorid je derivátem imidazolu, který má dva enantiomery. Tato látka je užívaná hojně v očních kapkách nebo nosních sprejích. Patří do skupiny léčiv známých jako sympatomimetické aminy, které mají schopnost dočasně zúžit krevní cévy v oku. K otoku kapiláry dochází při výskytu různých iritantů jako je např. dým, chlorovaná voda, vítr, prachové částice nebo různé alergie. Konkrétněji se tetryzolin řadí mezi alpha-agonisty pro alpha-2 receptory, které zajišťují žádoucí vasokonstrikci krevní kapiláry na očním povrchu [38].

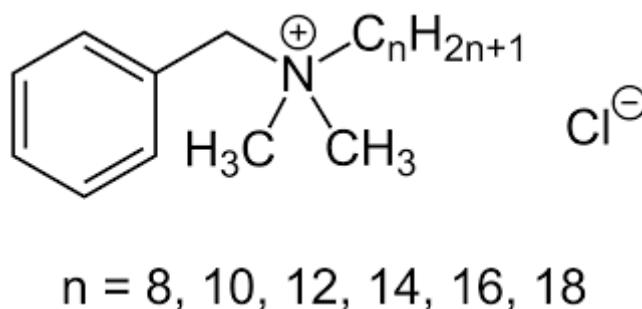


Obrázek 6: Enantiomery tetryzolinu [54]

2.3.1.2 Benzalkoniumchlorid

Označením benzalkoniumchlorid je myšlena směs alkylbenzyltrimethylamoniových chloridů s různými délkami alkylových řetězců. Strukturním názvem se jedná N-alkyl-n-benzyl-N,N-dimethylamin chlorid. Jedná se o kationtový surfaktant neboli kvartérní amoniouovou sůl, ve farmacii používanou jako konzervant. Tato látka používaná běžně v očních kapkách rozpouští stěny bakteriálních buněk a membrán [39]. Při pravidelném používání může docházet

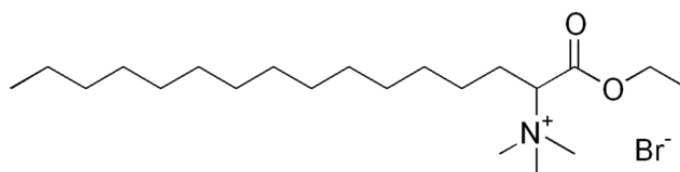
k porušení očního povrchu, poruchy funkčnosti gobletových buněk, nestabilitě slzného filmu, neovaskularizaci rohovky a mnoha dalších poruch. Z tohoto důvodu je při dlouhodobém užívání léčiv s BAK spojeno mnoho vedlejších účinků, například syndrom suchého oka nebo výskyt různých zánětů [39]. Zejména se projevují u pacientů se zeleným zákalem či jinou oční chorobou dochází k velmi častému výskytu potíží.



Obrázek 7: Strukturní vzorek benzalkoniachloridu [55]

2.3.2 Oční kapky OPTHALMO-SEPTONEX

Ophtalmo-Septonex je lékový prostředek vyskytující se ve formě očních kapek nebo masti. Jeho účinnou látkou je karbethopendeciniumbromid, jehož systematický název je: [1(ethoxykarbonyl)pentadecyl]trimethylamoniumbromid. Tato amoniová sloučenina se používá jako antiseptikum nebo dezinfekční látka, která brání rozmnožování bakterií a některých virů. Patří mezi kationtové tenzidy, které ve vodném prostředí disociují na kationty, kde dusík je nositelem kladného náboje. Dalšími důležitými složkami Ophtalmo-Septonexu jsou kyselina boritá a dekahydrát tetraboritanu sodného. Kyselina boritá neboli borová voda a dekahydrát tetraboritanu sodného se ve velmi zředěných roztocích využívají ke zmírnění zánětlivých procesů [36]. Mezi pomocné látky patří: guajazulen, silice plodu fenyklu obecného pravého, dihydrát dinatrium-edetátu, ethanol 96% (V/V) a voda.



Obrázek 8: Strukturní vzorec karbethopendeciniumbromidu

2.4 Bioadheze

Bioadheze je jev, při kterém dochází k přilnutí materiálu k biologickému povrchu. Pokud je biologickým povrchem mukózní membrána, potom mluvíme o mukoadhezi. Můžeme tedy říci, že mukoadheze je podskupinou bioadheze, a tudíž je i jejím mladším odvětvím. První zmínky v literatuře o adhezi byly publikovány v roce 1968 [13], zatímco první článek o mukoadhezi se objevil až o 9 let později v souvislosti s klinickým testováním lokálních

anestetik [14]. V průběhu dalších let byl tento jev intenzivně zkoumán a v současné době se adhezivní i mukoadhezivní systémy běžně používají pro aplikaci oční, vaginální, rektální, do dutiny ústní, nosní, do trávicího traktu nebo na pokožku. Výhodou těchto lékových forem je prodloužené uvolňování a tím i vyšší absorpce léčiva z místa aplikace.

2.4.1 Mukoadheze

Mukoadheze je formou bioadheze, kdy dochází k interakci s mukózní vrstvou, a to díky tvorbě adhezivních vazeb na hlenové vrstvě sliznice. Mukoadhezivní vazba vzniká ve dvou krocích. Nejprve dochází k těsnému povrchovému kontaktu, kdy jednotlivé fáze mohou interdifundovat. Následně dochází k tvorbě mezifázových sekundárních vazeb. Tento typ bioadheze je často využíván ve farmacii, jelikož je zodpovědný za prodloužení setrvání lékové formy v místě aplikace. Tento proces je charakterizován mnoha teoriemi, zejména difuzní, smáčecí, elektrickou, adsorpční a frakční. Zatím neexistuje žádná standartní metoda na posuzování mukoadheze obecně. Mezi bioadhezivní povrchy patří epitelární membrána. Pokud je membrána pokryta vrstvou hlenu, jako například epitel rohovky, nazýváme ji membránou mukózní. Jako substrát lze použít i vzorek hlenu, který se skládá převážně z mucinu.

2.4.2 Mukoadhezivní polymery

Polymery můžeme rozdělit do mnoha skupin, například na polymery s kladným nebo záporným nábojem a na polymery neiontové. Aniontové polymery využívají schopnost mukoadheze za tvorby vodíkových vazeb s povrchem sliznice. Kationtové polymery tvoří vazby se záporně nabitými řetězci mucinu. Volné thiolové skupiny podporují mukoadhezi díky tvorbě disulfidických můstků [4]. Park a Robinson poukázali na to, že polyanionty a karboxylované polymery, jsou upřednostňovány před polykationty jak v otázce adheze, tak i z hlediska potenciální toxicity [5].

2.4.3 Faktory ovlivňující vznik adhezivní vazby

Mukoadhezi ovlivňuje mnoho faktorů. Na vytvoření adhezivní vazby se podílí léčivý přípravek, místo jeho aplikace a fyziologické faktory organismu [2]. Dobré mukoadhezivní vlastnosti lze předpokládat, pokud polymerní látka obsahuje hydrofilní skupiny, které podpoří vznik vodíkových vazeb. Mezi tyto skupiny řadíme skupiny karboxylové, hydroxylové, aminoskupiny a sulfátové. Polymerní látka by měla vykazovat tyto vlastnosti: vysokou molekulovou hmotnost, flexibilní řetězce, musí být netoxická a biologicky odbouratelná.

2.4.4 Metody testování bioadheze

Již bylo provedeno mnoho pokusů se snahou stanovit mukoadhezivní vlastnosti různých polymerů. Výsledky metod však nejsou porovnatelné z důvodu různého experimentálního nastavení a špatné reprodukovatelnosti. Jako příklad lze uvést, že při stanovování bioadheze tablety nelze použít stejný test jako pro vyhodnocení míry bioadheze kapalných látek. Přestože jsou bioadhezivní lékové formy středem zájmu, standartní testovací metoda nebyla

navržena. Vyskytují se i zmínky o chybějícím specifickém parametru, který by jednotně charakterizoval bioadhezitu. V tabulce 1 můžeme vidět, že pro jeden typ mukoadhezivního polymeru v různých léčebných podobách se testovací metoda liší.

Tabulka 1: Mukoadhezivní polymery a testovací metody v závislosti na dávkování [3]

Polymer	Testovací metoda	Forma
Chitosan	Analýza struktury	Film
	Modifikovaný povrchový tenzometr	Gel
	Metoda s mucinem a BIACORE	Tableta
	Reologie	Tableta ve tvaru disku
	Elipsometrie	Roztok
Poly(akrylová kyselina)	Analýza struktury	Gel
	Modifikovaný povrchový tenzometr	Film
	Reologie	Tableta, tableta tvaru disku, roztok
Hyaluronan sodný	Analýza struktury	Gel

Velmi významnou roli hraje také volba tkáně, kdy se jako alternativa využívá zvířecí tkáň. Zde nastává problém zejména z hlediska etiky. Při testování probíhá nejdříve testování in vitro. Teprve na základě úspěšnosti tohoto testování dochází k testům in vivo. Testovací metody lze rozdělit do dvou kategorií. Metody, které zkoumající velikost síly potřebné k přerušení adhezivních vazeb, kam patří například analýza struktury, reologie či elipsometrie. Druhou kategorií jsou metody zkoumající množství částic adherovaných na tkáň či sliznici, mezi které patří metoda s mucinem a BIACORE, barvení koloidním stříbrem nebo průtoková metoda.

2.4.4.1 Metody zkoumající velikost síly potřebné k přerušení adhezivních vazeb

Metody určující sílu mezi bioadhezivním materiálem a substrátem jsou nejčastěji používané in vitro metody. V závislosti na směru působící síly rušící vazbu rozdělujeme testy smykové, peelingové a tahové. V praxi je bioadhezium od substrátu oddělováno kombinací sil tahových a smykových, kdy obě síly působí rovnoměrně na plochu kontaktu.

Peelingové zkoušky se využívají převážně u testování náplastí bukalních či transdermálních. Dochází k měření síly potřebné k odtržení náplasti, kdy síla je soustředěna na hranu spoje bioadheziva a substrátu.

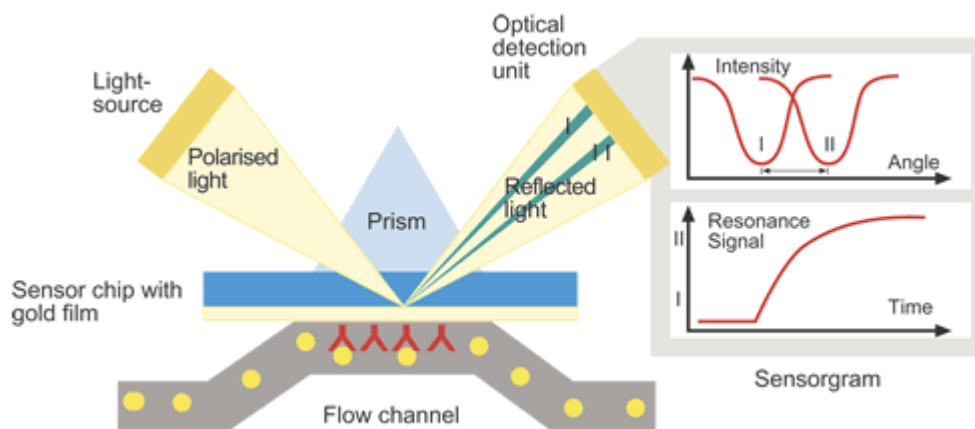
Smykové zkoušky využívají rovnoběžného směru působící síly se styčnou plochou bioadheziva k substrátu.

Tahové zkoušky patří mezi nepoužívanější metodu testování. Dochází u nich k rovnoměrnému působení síly kolmé k rovině přilnutí tensiometrem nebo jiným tahovým zařízením.

Na *reologické měření* je používán rotační Brookfieldův viskozimetr, do kterého je umístěna disperze mucinu o různých hodnotách pH [7]. Viskozimetrem byly vyhodnocovány různé typy polymeru (kationtový, aniontový, neutrální) o různých koncentracích. Bylo zjištěno, že se stoupající koncentrací se zvyšují i bioadhezivní síly.

2.4.4.2 Metody založené na interakci s mucinem a BIACORE

Dvě metody byly navrženy skupinou Takeuchi aj. pro měření mukoadheze polymeru s částicemi mucinu a BIACORE [6]. Metoda založená na interakci s částicemi mucinu využívá změny zeta potenciálu po interakci s polymerem, tudíž dochází ke změně povrchu. Různé polymery vedly k různým změnám zeta potenciálu. Velikost změny zeta potenciálu ovlivňuje afinita k mucinu, koncentrace a molekulová hmotnost polymeru. Výhoda této metody je zejména v její jednoduchosti. Její nevýhodou je nedostatečné přiblížení fyziologickým podmínkám. Další metodou k určení mukoadhezity je BIACORE systém. Metoda je založená na senzorickém čipu, který na svém povrchu detekuje přichycené molekuly pomocí povrchové plasmonové rezonance (SPR). SPR je spektrometrická metoda, detekující změnu indexu lomu po přichycení molekul polymeru k částicím mucinu.



Obrázek 9: Metoda BIACORE 13

2.4.4.3 Barvení koloidním zlatem

Metoda barvení koloidním zlatem byla objevena roku 1989. Metoda je založena na interakci mezi bioadhesivními polymery a červenými částicemi koloidního zlata, které jsou stabilizovány molekulami mucinu [8]. Míra výsledného červeného zbarvení je kvantitativním ukazatelem množství vazeb polymeru a konjugátu mucinu se zlatem. Měření bylo provedeno se zesíťovaným hydrogelem kyseliny akrylové, který byl vložen do kyvety s roztokem mucinu a zlata. Pro stanovení interakcí byly proužky hydrogelu v časových intervalech vytahovány a omývány roztokem pufru. Následně byla měřena absorbance a poté byl proužek polymeru kyseliny akrylové podroben mikroskopické obrazové analýze. Metodu barvení koloidním zlatem lze použít pouze pro nezbarvené struktury.

2.4.4.4 Falling liquid film metoda

Metoda pádu kapalného filmu je specifickou metodou k určení mukoadheze mikročástic. Různé mukoadhezivní polymery byly vybrány na pokrytí skleněných korálek a částic léčiva. Potažené i nepotažené mikročástice byly přiloženy k povrchu sliznice žaludku potkana v komoře s 80 % vlhkostí po dobu 20 minut, aby se mohla vytvořit mukoadhezivní vazba. Tkáň byla umístěna v nakloněné poloze a sliznice promyta. Následně bylo vyhodnoceno procento částic, které se nachází ve výstupním roztoku, čím získáme informaci o množství nepřichycených částic [9,10]. Dále bylo vyhodnoceno, jaké procento částic se naadsorbovalo na tkáň [11].

2.4.4.5 Zobrazovací technika-Gamma scintigrafie

Tato metody patří mezi nejpoužívanější metody testování bioadheze in vivo. Je to neinvazivní metoda, díky které je možné stanovit dobu a místo rozpadu a místo absorpce léčiva. Gama scintigrafie je založena na značení polymeru látkou vydávající gamma záření. K monitorování bioadheze lze využít také značení fluorescenční nebo radioaktivní látkou.

2.4.4.6 Průtoková metoda

Průtoková metoda patří mezi další in vitro metody. Poprvé ji popsal Rango Rao a Buri, kteří prováděli pokus se skleněnými kuličkami potaženými mukoadhezivními polymery, které byly vymývány z mukózní membrány fosfátovým pufrům [4]. Irmukhametova a kol. popsali vymývání fluorescenčně značených nanočástic z povrchu hovězí rohovky. Thioloované a pegylované organokřemičité nanočástice byly vymývány umělými slzami a následně vyhodnoceny fluorescenční mikroskopií [15]. Khutoriansky využil kombinace spektrometrické detekce současně s obrazovou analýzou pro dokonalejší monitorování bioadheziva na substrátu, kterým v tomto případě byla hovězí rohovka. Jako adhezivum byl použit roztok polymeru obarvený anilinovou modří. Eluát procházel kyvetou a průběžné měření absorbance poskytovalo údaje o retenci barviva na mukóze [16].

Princip průtokové metody vychází z inspirace lidským tělem. Membrána potažená polymerem s léčivou látkou je vystavena toku „tělní kapaliny“. Tok kapaliny způsobuje postupné vymývání lékové formy z membrány. Vyhodnocení může probíhat třemi způsoby. Můžeme sledovat dobu, za kterou se léková forma vymyje nebo množství vymyté lékové formy nebo naopak množství lékové formy zadržené na membráně. Pro stanovení množství léčivé látky zachycené na membráně lze využít některou z analytických metod, například spektrometrické či chromatografické, v závislosti na povaze stanovované látky. Pro získání relevantních hodnot by se podmínky měření měly co nejvíce blížit fyziologickému prostředí působení lékové formy. Mezi důležité faktory patří teplota a vlhkost mukózní membrány, složení tělní tekutiny nebo frekvence omývání sliznice.

Tento typ testování je vhodný především pro tekuté a polotekuté léčivé formy jako jsou gastrointestinální, vaginální, oční a ústní přípravky s místem účinku na mukózní sliznici omývané tělními tekutinami.

2.5 Využití nanočástic v kapkách

Oční přípravky se často potýkají s nízkou efektivitou. Oční povrch je kryt dvěma ochrannými bariérami – cornea, conjunctiva, které léčivo musí překonat. Nanočástice jsou schopné tyto obranné mechanismy, jako je mrkání a slzy překonat, díky interakci s očním povrchem. Důležitými a kritickými body absorpce je intracelulární pohyb DNA uložené v NP, jeho bioavailability a následná degradace v lysozomech. Zejména degradace se jeví jako klíčový krok [25].

2.5.1 Nanočástice s DNA

Využití nukleových kyselin v očních přípravcích by mělo vést k zvýšení efektivity léčiva. Tento předpoklad je založen na faktu, že geny jsou schopny exprimovat genetickou informaci po delší časový úsek, což zajišťuje větší efektivitu léčiva [22]. Tyto oční přípravky by mohly výrazně pomoci v léčbě dystrofie rohovky, suchého oka, imunitních chorob, neovaskularizaci rohovky nebo očních alergií [23, 24]. Na přípravu nanočástic je vhodné použít bioadhezivní a biokompatibilní polysacharidy.

2.5.2 Nanočástice HyA-CSO

Na přípravu nanočástic pro oční podání je vhodné použít bioadhezivní, biokompatibilní a biodegradabilní polysacharidy jako chitosan a hyaluronan.

Chitosan je netoxický, biokompatibilní, kladně nabitý polysacharid. Tento polysacharid zajišťuje dlouhodobou interakci s mukózním povrchem oka, čímž dochází ke prodloužení času setrvání očního přípravku na oční sliznici [22]. To zajišťuje průnik vyšší koncentrace enkapsulovaného léčiva do cílového místa. Nanočástice obsahující oligomery chitosanu vykazují dřívější uvolnění „nákladu“ a rychlejší degradaci ve srovnání s chitosanem.

Hyaluronan je biokompatibilní, biodegradabilní, záporně nabitý, tělu vlastní mukopolysacharid. V těle se podílí na migraci buněk a hojení díky dvěma receptorům CD44 a RHAMM. Receptor CD44 je využíván pro vstup do buněk.

Nanočástice HyA-CSO poskytují mnoho výhod. Jsou schopné sdružovat se s plazmidem, doručit plazmid do cílové buňky bez pocitu diskomfortu, podráždění oka nebo změnách v morfologii tkání či produkci slz [26]. Tyto NP využitelné pro topické přípravky musí splňovat mnoho kritérií. NP musí být schopné asociovat se s velkým množstvím DNA, což poskytuje možnost minimalizovat množství polymeru. Dále musí vykazovat malou velikost zajišťující interakci se sliznicí. Jejich povrchový náboj, může být přírůbodem dle potřeby měrem HyA:CS a to díky jejich rozdílným nábojům. Kladný náboj usnadňuje interakci s očním povrchem [27, 28], zatímco HyA hraje roli při interakci s buňkami epitelu [29, 30].

Ve studii Cílené doručení léčiv do oka pomocí nanočásticových komplexů [31] bylo zjištěno, že schopnost NP vstoupit do buněk rohovky je vyšší než u buněk spojivky. Rozdíl je spojován s expresí mucinu na povrch buněk spojivky, což by mohlo brzdit interakci s buněčnou membránou.

2.6 Buněčná absorpce

Je rozlišováno pět hlavních typů buněčné absorpce. Makropinocytóza a fagocytóza jsou endocytické procesy vyžadující jemně řízený proces reuspořádání aktinového skeletu. Rozdílem je, že u pinocytózy se jedná o pohlcení tekutin a růstových faktorů, zatímco u fagocytózy dochází k pohlcení pevných látek. Mechanismy zajišťující pohlcení makromolekulárních látek ve formě váčků tvořených z plazmatické membrány, které umožní průchod membránou jsou nazývány endocytózy využívající klathrin či caveolin.

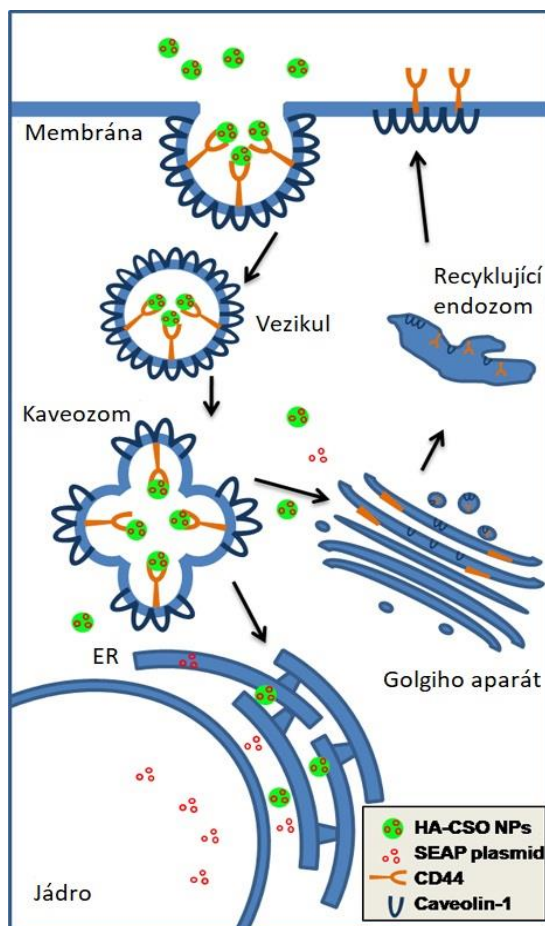
Při endocytóze vyžadující klathrin dochází k invaginaci plazmatické membrány a následnému vytvoření „klathrinového váčku“ spojením těžkých a lehkých řetězců klathrinu. V posledním kroku dochází k tzv. odstřižení váčku do buňky pomocí dynaminu III. Uvolněná vezikula splyne s brzkým endozomem či caveozomem uvnitř buňky.

Endocytóza spouštěná caveolinem patří mezi klathrin nezávislé mechanismy. Dochází k tvorbě caveolárních endocytických vezikul tzv. caveolae. Invaginace plazmatické membrány je spuštěna zvýšeným obsahem cholesterolu a proteinů caveolinu a kavinu. Odstřižení vezikuly je zprostředkováno pomocí dynaminu III. Uvolněná vezikula splyne s brzkým endosomem či caveozomem uvnitř buňky. Caveozom je typ endosomu s neutrálním pH obsahující látky pohlcené caveolární endocytózou postrádající endozomální markery. Posledním typem jsou klathrin a caveolin nezávislé mechanismy, které se vážou na glykosylfosfatidylinositolovou kotvu na buněčné membráně za vzniku brzkého endozomu.

2.6.1 Mechanismus interakce

Mechanismus absorpce HyA-CSO nanočástic začíná interakcí hyaluronové části NP s glykoproteinem CD44, který se nachází na plazmatické membráně. Dále dochází ke caveolární endocytóze. Prvním krokem této endocytózy je tvorba caveolae. Caveolae je vezikula tvořená invaginací plazmatické membrány. Caveolae obsahující nanočástice se může

spojit s kaveozomem, který následně doručí NP do subcelulárních komponent, jako jsou endoplazmatické retikulum nebo Golgiho aparát. Z endoplazmatického retikula se poté částice dostává do jádra.



Obrázek 10: Schématický nákres endocyty NP [22]

2.6.2 Degradace NP

Nanočástice jsou odbourávány aktivní degradací, která je nezávislá na lyzozomech. K degradaci jsou využity enzymy, katabolizující HyA či CS, které se běžně vyskytují na očním povrchu [32]. Mezi ty patří hyaluronidázy, chitinázy, lysozomy. Tento předpoklad však musí být ještě potvrzen.

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

S kyselinou hyaluronovou se můžeme běžně setkat ve velkém množství aplikací – například u topických přípravků. V této práci jsme se snažili prozkoumat možné interakce pro budoucí vylepšení očních kapek, kdy po přidání hyaluronanu by mělo dojít k zvýšení mukoadhezivity a zlepšení interakce s aktivní složkou kapek. To by poskytovalo prodlouženou dobu setrvání léčiva na očním povrchu. Současný stav řešené problematiky sleduje využití hyaluronanu v očních kapkách a jeho interakce.

Kyselina hyaluronová je tělu vlastní polysacharid, který působí protizánětlivě, hydratačně a biologicky je lehce odbouratelný. Bývá často přidávána do krémů, kde jejím hlavním účinkem je hydratace povrchu. Toho se také využívá v lékařství, například v nosních sprejích nebo očních přípravcích pro léčbu suchého oka. Kyselina hyaluronová tam zajišťuje kýženou hydrataci sliznice. Při dlouhodobém užívání lékových přípravků může docházet k porušení slzného filmu a ztrátě slzné tekutiny. Další aplikaci nachází v oblasti cílených nosičů léčiv s prodlouženým uvolňováním, pro které je klíčová vysoká afinita HyA na receptor CD44 [46].

Guter a Breunig [47] se ve své práci zaměřili na využití HyA v očních přípravcích. Hyaluronan poskytuje mnoho výjimečných vlastností. Jednou z nich je díky jeho extrémní hydrofobicitě schopnost vázat enormní množství vody. Mezi další vlastnosti patří zvýšení viskozity i při malých koncentracích nebo přístupné reakční skupiny po stranách řetězce. Díky jeho přítomnosti ve většině tkání v lidském těle je velmi dobře tolerovaný imunitním systémem. Svými vlastnostmi je ideální pro aplikaci na oční povrch, jelikož i při vyšších koncentracích zůstává transparentní a zároveň je biodegradabilní. Jeho inkorporace do očních čoček zvýšila a prodloužila pohodlí i při dlouhodobém nošení. Hyaluronan má také schopnost dopravovat terapeutické proteiny do požadovaného místa, například do zadního segmentu oka při intravitreální injekci. Ve své práci srovnávali hyaluronany o různých molekulových hmotnostech a jejich schopnost vázat se na CD44 receptor. Jedním ze sledovaných parametrů byl také zvlhčovací potenciál hyaluronanu, který byl stanoven pomocí měření tloušťky slzného filmu. Po aplikaci 0,15 % HyA došlo ke zvýšení tloušťky slzného filmu až po dobu 40 min. Přídavkem 3% trehalózy bylo docíleno zvýšení účinku po dobu 3hodin. To by mohlo být využito ke zvýšení pohodlí pacienta a snížení vedlejších účinků. Hyaluronanu bylo také využito pro zvýšení biologické dostupnosti anti-glaukomových parasymptomatometických pilokarpinových očních kapek u králíků jako modelového systému. V tomto experimentu došlo k prodloužení setrvávání léčiva na povrchu, avšak zvýšení účinnosti nebylo patrné. Pozitivního výsledku bylo dosaženo také použitím vyšší molekulové hmotnosti hyaluronanu, kdy bylo dosaženo stejného zúžení zornice, čehož bývá využito při měření biodostupnosti. Například při využití 0,75% roztoku 1600 kDa hyaluronanu nebo jen 0,125 % hyaluronanu o molekulové hmotnosti 4600 kDa bylo dosaženo stejných výsledků při sledování biodostupnosti.

Skupina vědců Salzillo, Schiraldi, Corsuto a spol. [48] se zaměřila na optimalizaci očních kapek na základě hyaluronanu. Oční kapky s hyaluronanem jako hlavní složkou, které jsou běžně dostupné, se liší nejen v molekulové hmotnosti hyaluronanu, ale i v koncentraci. K porovnání a vytvoření návrhu na efektivnější oční kapky bylo použito reologických měření

pro stanovení viskozity a určení mukoadhezivity u komerčně prodáváných přípravků. Z jejich výsledků vyplývá, že přípravky s HyA o nižší molekulové hmotnosti a vyšší koncentraci mají větší tendenci se zachytit na očním povrchu a odolat mrkání. Vítálních testů bylo použito pro stanovení míry ochrany epitelálních buněk před dehydratací za použití přeměny reazurinu na resofurin jako kvantitativního ukazatele. Z tohoto testování vyplývá, že buňky ošetřené nízkomolekulárním hyaluronanem jsou lépe chráněny před stresem ve srovnání s vysokomolekulárním hyaluronanem.

Thalberg a Lindmant 49 popisují interakce hyaluronanu s kationtovými tenzidy v závislosti na délce jejich alkylových řetězců. Pro zjištění chování systému hyaluronan-kationaktivní tenzid bylo využito následujících metod: vodivostních testů, fázová separace, NMR a solubilizace barviv. Výsledky prokázaly, že vazba mezi hyaluronanem a tenzidem je slabší než s jiným polyelektrolytem. Dále bylo stanoveno, že k navázání tenzidu na hyaluronan je žádoucí nízká koncentrace tenzidu c_1 , s minimálně deseti uhlíky v alkylovém řetězci. U tenzidů s nižším počtem uhlíků dochází k tvorbě micely a to z důvodu energetické výhodnosti.

Vliv kvartérních solí, benzalkonia chloridu, na konformaci hyaluronanu popisuje ve své práci *Grundělová a Mráček* [50]. Na základě DLS experimentů, viskozimetrie a měření povrchového napětí prováděných na vzorcích s hyaluronovými řetězci o molekulové hmotnosti 1,8MDa a 0,38MDa byla stanovena hypotéza uvádějící, že při určité koncentraci BAK hyaluronové řetězce agregují, čímž dochází k zvětšení polymerového řetězce. Tento jev byl pozorován v širokém rozsahu BAK koncentrací, kde byly nalezeny opakované změny ve velikosti polymerního řetězce. Prostorová konformace hyaluronového řetězce je dána vodíkovými vazbami a ty při nízkých koncentracích hyaluronanu mohou vlivem kvartérních solí jeho řetězce agregovat či tvořit duplexy. Změny v konformaci jsou spojeny s kritickou micelární koncentrací BAK a hydrofobickými interakcemi nepolárních segmentů BAK s hyaluronovými hydrofobními doménami. Z toho plyne, že již při lehkém zvýšení koncentrace BAK musí být zváženy intermolekulární a intramolekulové vazby v hydrofobní kostře a hydrofilních postranních řetězcích. Prostorové uspořádání hyaluronových řetězců je tedy úzce spojeno s CMC benzalkonia chloridu a ochotností nepolárních segmentů BAK interagovat s hydrofobním hyaluronanem. Tato hypotéza je podložena metodami DLS, tenzimetrií a viskozimetrií podporující předpoklad, že termodynamická ochota k interakcím BAK-BAK nebo NaHy-BAK se vyskytuje v hyaluronových roztocích na základě koncentrace BAK.

Interakce s mucinem sledovali *Yuan, Ritzoulis a Chen* [51]. V této práci se zabývali studiem interakce β -glukanů s mucinem pro aplikaci v gastrointestinálním traktu. Pomocí měření reologických měření bylo stanoveno, že reologický charakter β -glukanových roztoků se mění při smíchání s mucinem. Při nahrazení učitěho poměru β -glukanů mucinem dochází ke snížení viskozity. Efekt přidaného mucinu do roztoku β -glukanů je díky vyloučenému objemu, což vede ke zvýšení účinné koncentrace. Při srovnání vnitřní viskozity mucinu a β -glukanů bylo zjištěno, že mucin má mnohem kompaktnější strukturu a zaujímá menší objem. Mucinové řetězce orientují své vodíkové vazby směrem k vlastním cukrům, čímž poskytují prostor pro silné interakce s „cizími“ sacharidy.

Skupina vědců *Rossi, Bonferoni, Lippoli a spol.* [52] se zabývala sledováním vlivu mucinů rozdílného původu na reologické vlastnosti systému polymeru-mucinu. Této metody bylo využito i ke stanovení mukoadhezivních vlastností polymeru. Ve své práci srovnávali mucin z hovězích žláz se dvěma typy mucinů z prasečího žaludku pomocí reologických testů. Jako polymer byly vybrány polyakrylát a karboxymethylcelulóza. Bylo stanoveno, že muciny z prasečího žaludku poskytují pouze velmi malou nebo žádnou interakci s polymerem. V některých případech došlo i ke snížení viskozity. To mohlo být způsobeno díky přítomnosti iontů v mucinu, které zde zůstaly po procesu extrakce a purifikace z mateřské tkáně. Tyto ionty interagují s polymerem a mohou způsobit rozštěpení síťové struktury. Různými typy prostředí a stupni hydratace polymeru bylo stanoveno, že polyakrylová kyselina je velmi citlivá na přítomnost iontů a hodnoty pH. Stejně tak jsou i její reologické vlastnosti. Následně bylo potvrzeno, že muciny z prasečího žaludku obsahují mnoho iontů ve srovnání s mucinem z hovězích žláz. Po odstranění iontů pomocí dialýzy došlo k výraznému zvýšení interakce mezi mucinem a polymerem. Stejně měření bylo provedeno také s karboxymethylcelulózou. Různými typy prostředí a stupni hydratace polymeru, bylo zjištěno, že tento polymer není citlivý na ionty v okolním prostředí a změny pH. Tuto vlastnost bychom mohli přičíst fyzikálnímu propletení řetězců a nekovalentním vazbám mezi polymerem a řetězcem. Při srovnání reologických vlastností v různých typech mucinu byla i přes necitlivost polymeru k okolnímu prostředí zaznamenána výraznější interakce s mucinem z hovězích žláz než s mucinem z prasečího žaludku. Mukoadhezivní vlastnosti byly zvýšeny u všech typů mucinu, když před samotným měřením byla zařazena solubilizace nerozpustných glykoproteinů. Pro spolehlivé stanovení mukoadhezivní polymerů však stále chybí prostudovat mnoho faktorů, které by na toto stanovení mohly mít vliv.

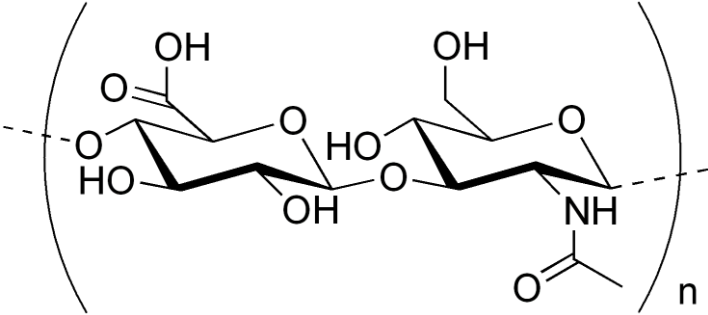
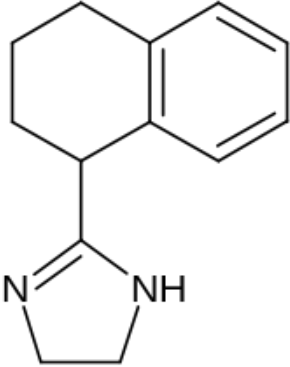
Porovnáním in vivo metod měřící mukoadhezi se zabývali *Ivarsson a Wahlgren* [57]. Byly vybrány metody elipsometrické, reologické a test pevnosti v tahu, které byly aplikovány na sedm vybraných polymerů. Jednalo se o karboxymethylcelulózu (CMC), hydroxyethylcelulózu (HEC), chitosan, polyvinylpyrrolidon (PVP), polyakrylovou kyselinu, Noveon (vysokomolekulární polymer kyseliny akrylové zesíťovaný divinylglykolem) a Carbopol (zesíťovaná polyakrylová kyselina). Bylo zjištěno, že PVP nevykazuje mukoadhezitu ani v jednom testu. Naopak CMC, Carbopol a Noveon vykazují mukoadhezivní vlastnosti v testu pevnosti v tahu a testu reologickém, zatímco žádnou mukoadhezivitu při měření elipsometrickém. Chitosan jako jediný polymer vykazoval mukoadhezivní výsledky i v elipsometrickém testování. Bohužel žádné metody neposkytovaly stejné hodnoty mukoadhezivní. Z toho plyne, že je třeba dále testovat mukoadhezivní metody pro dosažení jednoznačných výsledků a metody volit podle typu systému. Například na semi-solid systémy vhodné pro buňkové aplikace, by se hodila metoda pevnosti v tahu. Na elipsometrii je vhodné volit rozpuštěné polymery a tenké mukusové filmy. Viskozitní testování je obtížné interpretovat i pro vhodné systémy jako jsou silné mukusové vrstvy a polymerní roztoky. Tato metoda je však vhodná pro formulace, kde je viskozita důležitým faktorem jako například pro léčiva aplikovaná na nosní sliznici.

Skupina vědců *Contreras-Ruiz, Fuente, Párraga a spol.* [53] se zabývala intracelulárním přenosem nanočástic na bázi kyseliny hyaluronové a chitosanu do povrchových buněk oka. Nanočástice jsou slibnou alternativou pro léčbu mnoha očních poruch. Mají vhodnou

kompozici, velikost a zeta potenciál. Při jejich podání na oční povrch nedochází k toxicitě ani iritaci očního povrchu. Vědci se snažili určit, kterou dráhou dochází k pohlcení nanočástic buňkami rohovky a spojivky. To je důležité pro budoucí vylepšení aplikací a zjištění, jakou formou dochází k degradaci NP. K stanovení dráhy pohlcení bylo využito metody fluorescenční mikroskopie. Linie buněk byly vystaveny působení nanočástic po dobu jedné hodiny a následně vyhodnoceny. Po vyhodnocení bylo prokázáno, že v buňkách dochází k aktivnímu transportu nanočástic do buňky pomocí hyaluronového receptoru. Jedná se konkrétně o endocytickou dráhu závislou na kalveolinu s pozoruhodnou účinností transfekce. Pohlcením nanočástice nedošlo k ohrožení životaschopnosti buňky a NP byla metabolizována v průběhu 48hodin. Dále bylo zjištěno, že k degradaci nedochází za využití lysozomů, ale enzymů rozkládající chitosan či hyaluronan, které jsou běžně přítomné na očním povrchu. Tato zjištění dále podporují potenciální využití hyaluronových nanočástic pro přenos genetického materiálu do očního povrchu.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

<p>Hyaluronan sodný</p>  <p>1400-1600 kDa, Contipro Biotech s.r.o., č.š. 181214-4 - D1, vlhkost 8,6 % 250-450 kDa, Contipro Biotech s.r.o., č.š. 230215 - E1, vlhkost 7,9 %</p>
<p>Tetryzolin</p>  <p><u>Vzorec:</u> $C_{13}H_{16}N_2$ <u>Molární hmotnost:</u> 200,28 g/mol Sigma-Aldrich s.r.o., š.SLBW9308</p>
<p>Benzalkonium chlorid (benzyl-dimethyl-tridecyl-azanium chloride) <u>Vzorec:</u> $C_6H_5CH_2N(CH_3)_2RCl$ <u>Hustota:</u> 980 kg/m³ Sigma-Aldrich s.r.o., š.BCBX919</p>
<p>Mucin from porcine stomach Sigma-Aldrich s.r.o, š SLBX8709</p>

4.2 Příprava zásobních roztoků

4.2.1 Příprava roztoku hyaluronanu HyA_a a HyA_b

Byly připraveny zásobní roztoky nízkomolekulárního (HyA_a) a vysokomolekulárního hyaluronanu (HyA_b). Do suché vialky bylo na analytických vahách naváženo potřebné množství hyaluronanu sodného HyA_a nebo HyA_b na výslednou koncentraci 2 g/l a doplněno na požadovaný objem. Roztok byl ponechán řádně promíchat pro dokonalé nabobtnání a rozpletení řetězců.

4.2.2 Příprava modelových očních kapek Septonex

Dle příbalového letáku bylo zjištěno, že oční kapky obsahují 3 hlavní účinné látky: karbetopendeciniumbromid, kyselinu boritou a dekahydrát tetraboritanu sodného [33]. Tyto látky byly smíchány dle příbalového letáku a ponechány míchat pro dokonalé rozpuštění.

4.2.3 Příprava boritého roztoku

V zásobní láhvi bylo rozpuštěno v 400 ml 7,5 g kyseliny borité a 0,2 g dekahydrátu tetraboritanu sodného a ponecháno na míchačce nejméně 6 hodin pro dokonalé rozpuštění.

4.3 Příprava vzorků

4.3.1 Příprava systémů s tetryzolinem

Do dvou sad po desíti připravených vialek bylo naváženo 5 mg tetryzolinu-hydrochloridu. Vialky byly doplněny boritým roztokem na 10 ml. Do takto připravených vzorků byly přidávány přídavky HyA_a nebo HyA_b.

4.3.2 Příprava systémů s benzalkonium chloridem

Pro přípravu zásobního 0,02 % roztoku BAK ve vodě bylo rozpuštěno 0,15 g semisolid BAK v 1,35 ml demi vody (viz výpočet). Do každé vialky bylo napipetováno 20 µl zásobního roztoku BAK a doplněno roztokem „očních kapek“ na 10 ml. Do takto připravených systémů byly přidány zvyšující se přídavky předem připraveného roztoku HyA_a nebo HyA_b.

Ze směšovací rovnice bylo vypočítáno potřebné množství BAK pro přípravu zásobního roztoku

$$m_1 \cdot w_1 + m_2 \cdot w_2 = (m_1 + m_2) \cdot w_3$$

$$0,15 \cdot 0,95 = (1,35 + 0,15) \cdot w_3$$

$$w_3 = 9,5 \%$$

Výpočet přídatku 9,5 % BAK pro namíchání 0,02 % roztoku

$$m_1 \cdot w_1 + m_2 \cdot w_2 = (m_1 + m_2) \cdot w_3$$

$$x \cdot 0,095 = 10 \cdot 0,0002$$

$$x = 20 \mu\text{l}$$

Kde m_1 a m_2 jsou hmotnosti roztoku vody či benzalkonia a w_1 , w_2 , w_3 zastupují procentuální koncentrace roztoků.

4.3.3 Příprava systémů s očními kapkami VISINE či Ophthalmo-Septonex

Roztok hyaluronanu sodného o koncentraci 2 g/l byl napipetován do daného objemu očních kapek pro získání výsledné koncentrace v rozsahu 0,0006 – 0,0028 %.

4.3.4 Příprava systémů pro reologické testování

Byly připraveny systémy očních kapek VISINE a Ophthalmo-Septonex s přídatkem 80 μl hyaluronanu ($c=2$ g/l). Do každého systému byl přidán mucin do výsledné koncentrace 4 % a ponechán nabobtnat.

4.4 POUŽITÉ METODY

4.4.1 Měření velikosti

Pro měření velikosti částic bylo použito přístroje Zetasizer Nano ZS, který využívá dynamického rozptylu částic v submikronové oblasti – DLS (Dynamic Light Scattering). Tato metoda je rovněž známá jako fotonová korelační spektroskopie. Metoda DLS slouží ke stanovení velikosti částic v nesedimentujících koloidních dispersích [37]. Na částice, které se pohybují na základě Brownova pohybu, dopadá laserový paprsek červeného světla. Brownův pohyb částic je pohyb, který vzniká díky náhodné srážce částice s molekulou kapaliny. Tento pohyb je také závislý na teplotě roztoku. Díky tomu dochází k fluktuacím rozptýleného světla, které je snímáno pomocí nastavitelné optiky pro různě velké částice [35]. Změny intenzity jsou analyzovány digitálním autokorelátorem, který vytváří korelační křivku. Touto křivkou lze analyzovat velikost a její distribuci. Důležitým faktem je, že menší částice se pohybují rychleji než částice větší. Vztah mezi velikostí a rychlostí částice je definovaný pomocí Stokes-Einsteinovy rovnice. Získaná hodnota se nazývá hydrodynamický průměr a odpovídá průměru koule, která by měla za stejných podmínek stejný difúzní koeficient [37].

4.4.2 Měření zeta potenciálu

Zeta potenciál je povrchový náboj částice v daném médiu a vyjadřuje zejména povahu a stabilitu koloidního systému. Částice s velkými náboji budou po delší dobu odolávat flokulaci a agregaci [42]. Nabitá molekula kolem sebe tvoří elektrickou dvojvrstvu. Dvojvrstva se skládá z vnitřní – Sternovy vrstvy, ve které jsou ionty pevně vázané a z vnější neboli difúzní vrstvy,

ve které jsou ionty vázány pouze slabě. Uvnitř difúzní vrstvy se nachází teoretická hranice, která se označuje jako rovina skluzu. Za touto hranicí ionty již netvoří stabilní jednotku a při pohybu se částice za touto hranicí s molekulou již nepohybují. Potenciál na této hranici se nazývá zeta potenciál. Stanovení zeta potenciálu spočívá v měření rychlosti pohybu částic při aplikaci elektrického pole. Nabité částice se pohybují k elektrodě rychlostí úměrnou jejich náboji [43]. Za stabilní se považují systémy, které mají hodnotu potenciálu vyšší než 30mV nebo menší než -30mV. Systémy s nulovým zeta potenciálem jsou považovány za nejméně stabilní. Bod nulového zeta potenciálu se nazývá izoelektrický bod [42].

4.4.3 Měření viskozity

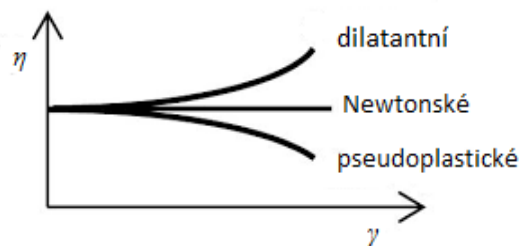
Kapaliny jsou látky, které tečou – tj. deformují se účinkem vnější síly. Tokové chování popisuje viskozita, která určuje míru vnitřního odporu materiálů vůči vnějšímu zatížení. Základním vztahem definujícím viskozitu je Newtonův zákon, který stanovuje vztah mezi smykovým napětím τ a rychlostí smykové deformace γ [45]. Dynamická viskozita η zde vyjadřuje konstantu úměrnosti. Znění zákona je uvedeno v následující rovnici:

$$\tau = \eta \cdot \frac{dv}{dy} = \eta \cdot \gamma \quad (1)$$

Při malých rychlostech proudění dochází ke smykové deformaci, kterou charakterizuje smykové napětí. Pokud kapalina proudí laminárně, vzniká mezi vrstvami kapaliny tečné napětí, které je způsobeno mezimolekulárními silami. Podle způsobu měření rozlišujeme viskozitu dynamickou, charakterizující vnitřní tření a viskozitu kinematickou, která je podílem dynamické viskozity η a hustoty ρ kapaliny. Kinematická viskozita se využívá se při popisu hydrodynamiky kapalin a je dána následující rovnicí:

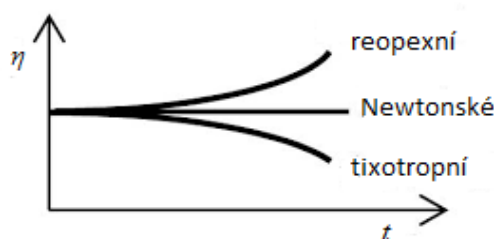
$$\nu [m^2 / s] = \frac{\eta}{\rho} \quad (2)$$

Látky, které se při působení smykového napětí chovají podle Newtonova zákona, se označují jako newtonské. Hodnota jejich viskozity je nezávislá na rychlosti smykového tření a na čase. Kapaliny, které se nechovají podle Newtonova zákona, nazýváme nenewtonské. Jejich viskozita může v závislosti na smykovém napětí klesat – kapaliny pseudoplastické, či vzrůstat – kapaliny diletantní [45].



Obrázek 11: Závislost viskozity na smykové deformaci

Dále rozlišujeme neneutonské kapaliny, u kterých se viskozita mění s dobou působení. Pokud viskozita s časem klesá, jedná se o kapaliny tixotropní. Jestliže s časem viskozita stoupá, nazýváme tyto kapaliny reopexní [44].



Obrázek 12: Závislost viskozity na čase

4.4.4 Mucinová metoda

Mucinové metody se využívá pro stanovení mukoadhezivity polymeru. Touto metodou se snažíme přiblížit reálným podmínkám, v našem případě očnímu povrchu. Metoda je založená na srovnání viskozity mezi dvěma systémy. Prvním je vzorek smíchaný s mucinem, druhý systém tvoří viskozity samostatných složek. Mukoadhezivní index je pak vypočítán dle následujícího vzorce:

$$\Delta(\%) = \frac{\eta_{muc+OPT+HyA} - (\eta_{muc+OPT} + \eta_{HyA})}{\eta_{muc+OPT} + \eta_{HyA}} \cdot 100 \quad (5)$$

kde $\Delta(\%)$ mukoadhezivní index, η je dynamická viskozita [48]. Výpočet vychází z předpokladu, že mukoadhezivní polymer $\eta_{muc+OPT+HyA}$ má viskozitu vyšší než samostatné složky $\eta_{muc+OPT}$ a η_{HyA} a to díky interakcím vyskytujícím se mezi polymerem a mucinem [8].

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Vizuální sledování

5.1.1 Sledování systému VIS+HyA

Vybraným systémem byl roztok očních kapek VISINE o objemu 10ml s různými přísadami roztoku HyA ($c = 2 \text{ g/l}$) a molekulové hmotnosti a) 250–450kDa nebo b) 1400–600kDa. Přísady byly voleny na základě poznatků zjištěných v bakalářské práci. Tabulka 2 zobrazuje výsledky vizuálního sledování připravených systémů po dobu dvou měsíců. Zhruba okolo měsíce se v roztocích začaly objevovat sraženiny. Počet sraženin se v průběhu dalšího měsíce znatelně zvýšil.

Tabulka 2: Sledování stability HyA+Visine

Přídavek HyA [μl/10ml]	Po dni		Po měsíci		Po 2 měsících	
	HyA ^a	HyA ^b	HyA ^a	HyA ^b	HyA ^a	HyA ^b
60	čirý roztok	čirý roztok	čirý roztok, bez sraženin	čirý roztok, jedna sraženina	čirý roztok, 4 sraženiny	čirý roztok, 6 malých sraženin
80	čirý roztok	čirý roztok	čirý roztok, jedna sraženina	čirý roztok bez sraženin	čirý roztok, mnoho malých sraženin	čirý roztok, 5 malých sraženin
100	čirý roztok	čirý roztok	čirý roztok, bez sraženin	čirý roztok bez sraženin	čirý roztok, 3 malé sraženiny	čirý roztok, 3 větší sraženiny
120	čirý roztok	čirý roztok	čirý roztok, bez sraženin	čirý roztok, jedna sraženina	čirý roztok, 7 malých sraženin	čirý roztok, 7 malých i velkých sraženin
140	čirý roztok	čirý roztok	čirý roztok, jedna sraženina	čirý roztok, jedna sraženina	čirý roztok, více malých sraženin	čirý roztok, více malých i velkých sraženin

Z důvodu nečekaného vysrážení z původně vybraných koncentrací byly stejným postupem připraveny systémy s nižší koncentrací HyA.

Tabulka 3: Sledování stability HyA+VISINE

Přídavek HyA [μl/10ml]	Po dni		Po měsíci		Po 2 měsících	
	HyA ^a	HyA ^b	HyA ^a	HyA ^b	HyA ^a	HyA ^b
30	čirý roztok	čirý roztok	1 sraženina	více sraženin	několik sraženin	mnoho malých či velkých sraženin
40	čirý roztok	čirý roztok	2 sraženiny	více sraženin	několik sraženin	mnoho malých či velkých sraženin

Také v tomto případě došlo k vysrážení malých, těžkoviditelných řetězců, avšak s delším časovým odstupem.

5.1.2 Sledování modelových kapek Septonex+HyA

Systémy byly připraveny stejným postupem, jako v odstavci 5.1 s hyaluronanem HyA_b. Hyaluronan byl napipetován do 10 ml připravených očních kapek. Vzorky byly sledovány do vysrážení sraženin.

Tabulka 4: Sledování stability HyA+oční kapky Septonex

Přídavek HyA [μl]	Po dni	Po měsíci
20	čirý roztok	několik sraženin
30	čirý roztok	několik sraženin
40	čirý roztok	několik sraženin
50	lehce zakalené	několik sraženin
60	lehce zakalené, sraženiny	-
80	lehce zakalené, sraženiny	-
100	lehce zakalené, sraženiny	-
120	lehce zakalené, sraženiny	-

Z Tabulka 4 je patrné, že po snížení přídavku hyaluronanu roztok zůstal čirý a sraženiny se začaly vyskytovat později, zhruba okolo měsíce po namíchání.

5.1.3 Výpočet koncentrace roztoků

Výpočet maximální a minimální koncentrace HyA připravených roztoků pro srovnání s přípravky volně dostupných na trhu. Pro výpočet vycházíme z rovnice

$$c_1 \cdot v_1 + c_2 \cdot v_2 = c_3 \cdot v_3 \quad (3)$$

kde c_1 , c_2 , značí látkovou koncentraci výchozích roztoků a v_1 , v_2 , objemy výchozích roztoků c_3 a v_3 udávají koncentraci a objem výsledného roztoku.

Po dosazení hodnot do rovnice s maximálním přídatkem:

$$2 \cdot 140 = c_3 \cdot 10140$$

$$c_3 = 0,02761 \text{ g/l}$$

Po dosazení do rovnice s minimálním přídatkem:

$$2 \cdot 60 = c_3 \cdot 10060$$

$$c_3 = 0,01193 \text{ g/l}$$

Koncentrace zkoumaných roztoků se pohybuje od 0,01193 – 0,02761 g/l.

5.1.4 Výpočet procentuální koncentrace roztoků

Pro porovnání s komerčně prodávány léčivými přípravky je nutné přepočítat hodnotu vypočtené koncentrace HyA na procentuální:

$$\rho_{hm} = \frac{m_{HyA}}{m_{H_2O}} = \frac{c_{HyA} \cdot V_{HyA}}{\rho_{H_2O} \cdot V_{tot}} \quad (4)$$

Dosazení hodnot pro maximální koncentraci:

$$\rho_{hm} = \frac{2 \cdot 140}{1000 \cdot 10140} = 0,0028 \%$$

Dosazení hodnot pro minimální koncentraci:

$$\rho_{hm} = \frac{2 \cdot 60}{1000 \cdot 10060} = 0,0012 \%$$

Koncentrace HyA přidaného do očních kapek nepřesáhla 0,0028 %. Ve srovnání s očními kapkami Bepathen, je koncentrace HyA udávaná v příbalovém letáku mnohonásobně vyšší než u zkoumaných modelových systémy [21].

5.2 Zkoumání kationtových složek očních kapek

Cílem pozorování bylo sledovat chování různých systému s přídavkem hyaluronanu. Bylo sledováno deset roztoků o konstantní koncentraci tetryzolin-hydrochloridu nebo benzalkonium-chloridu. Do všech systému byla přidán roztok hyaluronanu o rostoucí koncentraci. Koncentrace tetryzolin-hydrochloridu byla použita stejná jako v kapkách Visine. Obě kationtové složky byly sledovány v boritém prostředí.

5.2.1 Vizualní sledování s tetryzolinem

Do dvou sad po desíti připravených vialek bylo naváženo 5mg tetryzolinu-hydrochloridu. Vialky byly doplněny boritým roztokem na 10ml. Do takto připravených vzorků byly přidávány přídavky HyA_a a HyA_b. Takto připravené komplexy byly sledovány vizuálně v 24 h intervalech po dobu 3 dnů. Po 3 dnech se jejich vzhled již neměnil.

Tabulka 5: Sledování systému nízkomolekulárního HyA s tetryzolinem

Přídavek [μl/10ml]	Po namíchání (po 6 hod.) a po dni	Po 2 a 3 dnech
30	Mnoho malých sraženin	Mnoho malých sraženin
40	Mnoho malých sraženin	Mnoho malých sraženin
50	Mnoho malých sraženin i delší řetězce	Mnoho malých sraženin i delší řetězce
60	Mnoho menších sraženin	Mnoho malých sraženin
70	Mnoho menších sraženin	Mnoho menších sraženin
80	Mnoho menších sraženin	Mnoho menších sraženin
90	Mnoho menších sraženin	Mnoho menších sraženin
100	Mnoho menších sraženin	Mnoho menších sraženin
120	Nejvíce sraženin	Mnoho menších sraženin
140	Nejvíce sraženin	Mnoho menších sraženin

Všechny vzorky v průběhu sledování zůstaly čiré. Od 60 μl se postupně výskyt sraženin zvětšoval. Stejně sledování bylo provedeno i pro vysokomolekulární hyaluronan.

Tabulka 6: Sledování systému vysokomolekulárního HyA s tetryzolinem

Přídavek [μl/10ml]	Po namíchání (po 6 hod.) a po dni	Po 2 a 3 dnech
30	Mnoho malých sraženin	Mnoho malinkých sraženin
40	Mnoho malých sraženin	Mnoho malinkých sraženin
50	Méně malých sraženin	Mnoho malinkých sraženin
60	Méně malých a pár větších sraženin	Mnoho větších i menších sraženin
70	Méně malých a pár větších sraženin	Mnoho větších i menších sraženin
80	Méně malých a pár větších sraženin	Mnoho větších i menších sraženin
90	Méně malých a pár větších sraženin	Mnoho větších i menších sraženin
100	Méně malých a pár větších sraženin	Mnoho větších i menších sraženin
120	Více delších a větších sraženin	Více delších a větších sraženin
140	Více delších a větších sraženin	Více delších a větších sraženin

Stejně jako u nízkomolekulárních systémů vzorky zůstaly čiré, nezakalené. Se zvyšující se koncentrací byl pozorován výskyt větších vysrážených řetězců.

5.2.2 Vizualní sledování s benzalkonium chloridem

Pro vizualní sledování interakcí boritého prostředí, benzalkonia chloridu a hyaluronanu byla vybrána koncentrace BAK stejná jako v očních přípravcích pro léčbu glaukomu. Vzorky připravené podle odstavce 4.3.2 byly sledovány pod obou 4 dnů napřed s nízkomolekulárním hyaluronanem (HyA_a) následně s vysokomolekulárním hyaluronanem (HyA_b). Sledování bylo ukončeno již po 3 dnech, vzhled vzorků se dále neměnil.

Tabulka 7: Systémy s BAK a nízkomol. HyA

Nízkomol. HyA	Přídavek [μl/10ml]	Po namíchání, po 1 dni	Po 2 a 3 dnech
1	30	Mnoho malých sraženin	Lehký mléčný zákal, velké i malé sraženiny
2	40	Mnoho malých sraženin i delší řetězec	Lehký mléčný zákal, velké i malé sraženiny
3	50	Malé i pár větších sraženin	Lehký mléčný zákal, pár větších sraženin
4	60	Malé i pár větších sraženin	Malé sraženiny

5	70	Větší sraženiny, delší řetězce	Mnoho větších sraženin
6	80	Větší sraženiny, delší řetězce	Mnoho větších sraženin
7	90	Mnoho větších sraženin	Mnoho větších sraženin
8	100	Mnoho větších sraženin	Mnoho větších sraženin
9	120	Mnoho menších i větších sraženin	Mnoho menších i větších sraženin
10	140	Mnoho menších i větších sraženin	Mnoho menších i větších sraženin

Tabulka 8 zobrazuje systémy s různými přídávky vysokomolekulárního hyaluronanu.

Tabulka 8: Systémy s BAK a vysokomol. HyA

Vysokomol.HyA	Přídavek [μl/10ml]	Po namíchání (po 6hod.), po 1dni	Po 2 a 3 dnech
1	30	Lehký mléčný zákal, mnoho malých sraženin	Lehký mléčný zákal, mnoho malinkých sraženin
2	40	Lehký mléčný zákal, mnoho malých sraženin	Lehký mléčný zákal, mnoho malinkých sraženin
3	50	Lehký mléčný zákal, mnoho malých sraženin	Mnoho malých sraženin
4	60	Mnoho malých sraženin	Lehký mléčný zákal, mnoho malých sraženin
5	70	Lehký mléčný zákal, mnoho malých sraženin	Lehký mléčný zákal, mnoho malých sraženin
6	80	Mnoho malých sraženin	Více větších sraženin
7	90	Mnoho menších i větších sraženin	Více větších sraženin
8	100	Mnoho menších i větších sraženin	Více větších sraženin
9	120	Mnoho menších i větších sraženin	Mnoho větších sraženin
10	140	Mnoho sraženin	Mnoho sraženin

V připravených vzorcích byl u větších přídavek pozorován lehký mléčný zákal, v ostatním vzorcích došlo k výskytu „chuchvalečků“. Zakalené vzorky naznačují, že koncentrace hyaluronanu ve vzorku je příliš velká pro použití do očních kapek.

5.3 Měření zeta potenciálu

Byly vybrány vzorky očních kapek, tetryzolinu a benzalkonia chloridu s přídavky hyaluronanu. Posledním vzorkem byl roztok boritého prostředí s přídavkem hyaluronanu. Vzorky byly připraveny dle kapitoly 4.3 a následně proměřeny. Zeta potenciál byl proměřen pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS. Bylo změřeno 20 vzorků po 12 skenech při teplotě 25 °C pro HyA_a a HyA_b. Pro měření byla použita dip elektroda a skleněná kyveta.

Tabulka 9 zobrazuje průměrné hodnoty naměřených potenciálů [mV] pro různé přídavky vysokomolekulárního hyaluronanu do různých systémů v čase. Vzorky byly měřeny ve 24 hodinových intervalech po dobu 4 dnů, poté ještě jednou po 8 dnech od namíchání.

Tabulka 9: Měření zeta potenciálu vzorků s přídavkem vysokomolekul. HyA v čase

Boritý roztok s přídavky kyseliny hyaluronové					
Vzorek/čas	1d	2d	3d	4d	8d
HyA 30	-27.2	-28.4	-23.0	-22.8	-19.2
HyA 60	-26.4	-25.6	-22.9	-22.9	-22.1
HyA 80	-18.5	-27.5	-20.4	-25.4	-23.6
HyA 140	-28.2	-28.8	-16.9	-27.4	-25.4
Roztok tetryzolinu s přídavky kyseliny hyaluronové					
Tetr+HyA 30	-27.2	-28.4	-22.7	-23.7	-24.4
Tetr+HyA 60	-26.4	-25.6	-22.7	-28.0	-28.4
Tetr+HyA 80	-18.5	-27.5	-23.6	-26.1	-23.5
Tetr+HyA 140	-28.2	-28.8	-3.5	-28.7	-28.5
Roztok benzalkonia chloridu s přídavky kyseliny hyaluronové					
BAK+HyA 30	-4.9	-7.9	-8.4	-9.3	-9.8
BAK+HyA 60	-10.8	-10.8	-11.0	-11.6	-12.2
BAK+HyA 80	-13.2	-13.4	-14.1	-15.8	-14.5
BAK+HyA 140	-18.6	-18.3	-18.8	-21.7	-17.5
Oční kapky VISINE s přídavky kyseliny hyaluronové					
VIS+HyA 30	-20.0	-18.0	-19.5	-22.1	-18.7
VIS+HyA 60	-20.9	-21.8	-23.4	-20.9	-22.2
VIS+HyA 80	-22.3	-22.1	-22.9	-23.0	-23.7
VIS+HyA 140	-20.3	-21.1	-21.9	-24.2	-23.0
Oční kapky Ophthalmo-Septonex s přídavky kyseliny hyaluronové					
OPT+HyA 30	9.8	9.1	9.3	9.5	8.3
OPT+HyA 60	9.1	9.2	9.1	9.3	10.3
OPT+HyA 80	8.9	8.8	9.2	9.3	8.7
OPT+HyA 140	9.0	8.7	8.7	9.1	8.3

Z tabulky je patrné, že ve většině případů došlo ke zvýšení záporné hodnoty potenciálu po 4 dnech. Tato hodnota se s čtyřdenním odstupem zase snížila. Hodnoty systému kapek Ophthalmo-Septonex se jako jediné pohybovaly v kladných hodnotách. To bylo způsobeno kladně nabitým řetězcem povrchově aktivního karbetopendecinium bromidu. Při měření po 8 dnech od namíchání systému můžeme vidět sníženou hodnotu kladného potenciálu. Z toho předpokládat navázání hyaluronanu na karbetopendeciniové řetězce.

Tabulka 10 zobrazuje vypočítané průměrné hodnoty naměřených potenciálů [mV] pro různé přídavky nízkomolekulárního hyaluronanu do různých systémů v čase. Vzorky byly měřeny ve 24 hodinových intervalech po dobu 4 dnů, poté ještě jednou po 8 dnech od namíchání.

Tabulka 10: Měření zeta potenciálu vzorků s přídavkem nízkomol. HyA v čase

Boritý roztok s přídavky kyseliny hyaluronové					
Vzorek/čas	1d	2d	3d	4d	8d
HyA 30	-22.3	-22.2	-26.1	-23.5	-24.6
HyA 60	-23.3	-23.1	-21.3	-22.4	-29.5
HyA 80	-19.1	-24.7	-27.4	-26.7	-25.5
HyA 140	-21.4	-24.3	-28.2	-27.8	-30.8
Roztok tetryzolinu s přídavky kyseliny hyaluronové					
Tetr+HyA 30	-25.7	-27.6	-25.4	-25.8	-23.1
Tetr+HyA 60	-23.2	-24.4	-25.0	-24.9	-29.2
Tetr+HyA 80	-25.4	-26.4	-23.7	-26.0	-24.0
Tetr+HyA 140	-21.4	-27.4	-30.0	-23.3	-28.3
Roztok benzalkonia chloridu s přídavky kyseliny hyaluronové					
BAK+HyA 30	-12.6	-13.1	-13.0	-14.5	-14.9
BAK+HyA 60	-10.6	-13.1	-11.6	-12.4	-13.2
BAK+HyA 80	-12.8	-13.8	-13.2	-13.8	-15.0
BAK+HyA 140	-15.9	-18.2	-18.2	-19.9	-16.7
Oční kapky VISINE s přídavky kyseliny hyaluronové					
VIS+HyA 30	-20.7	-20.5	-21.8	-21.2	-15.1
VIS+HyA 60	-22.0	-23.1	-23.8	-20.6	-22.4
VIS+HyA 80	-22.8	-21.8	-21.2	-23.6	-21.1
VIS+HyA 140	-24.6	-20.0	-22.3	-20.4	-21.3
Oční kapky Ophthalmo-Septonex s přídavky kyseliny hyaluronové					
OPT+HyA 30	9.1	9.8	8.6	9.1	9.2
OPT+HyA 60	8.7	9.5	8.9	9.1	9.2
OPT+HyA 80	9.0	9.5	8.8	8.8	9.0
OPT+HyA 140	8.5	9.2	8.4	8.7	8.8

Z tabulky je patrné, že ve většině případů došlo ke zvýšení záporné hodnoty potenciálu po 4 dnech. Nejmenší záporné hodnoty se vyskytovaly u systému s benzalkoniem chloridem a to pravděpodobně v důsledku nízké koncentrace benzalkonia chloridu.

Tabulka 11 zobrazuje zeta potenciály samotných systémů bez přídavku hyaluronanu.

Tabulka 11: Zeta potenciál systémů bez přídavku HyA

Vzorek	ZP [mV]
OpthalgoSeptonex	8.6167
Visine	-2.7175
Boritý roztok	-21.0667

Z výsledků pozorování zeta potenciálu můžeme říct, že v průběhu času dochází k jemnému kolísání hodnot zeta potenciálu. Nejedná se však o zásadní změny, ze kterých bychom mohli usuzovat radikální změny v roztoku.

Na obrázku 13 můžeme vidět, že u vzorků s očními kapkami Opthalgo-Septonex a rostoucím přídavkem hyaluronanu došlo k mírnému zakalení v průběhu 8 dní, po které byl vzorek proměřován.



Obrázek 13: Očních kapky Opthalgo-Septonex (OPT) a VISINE (VIS) s rostoucím přídavkem hyaluronanu

5.4 Měření velikosti částic

Pro měření velikosti částic byla vybrána metoda dynamického rozptylu světla – DLS. Byly vybrány stejné vzorky, jak pro měření zeta potenciálu (viz. odstavec 4.4.2) s přídavky 30 μ l, 60 μ l, 80 μ l a 140 μ l roztoku hyaluronanu do 10 ml roztoku. Vzorky byly připraveny dle výše popsaného postupu v odstavci 4.3. Následně byly měřeny po namíchání a dále ve 24 hodinových intervalech po dobu 4 dnů. Pro kontrolu ještě následně přeměřeny po 8 dnech. Každé měření proběhlo třikrát. Pro velké množství výsledků byla data vyhodnocena metodou „Average result“.

5.4.1 Boritý roztok s HyA_a

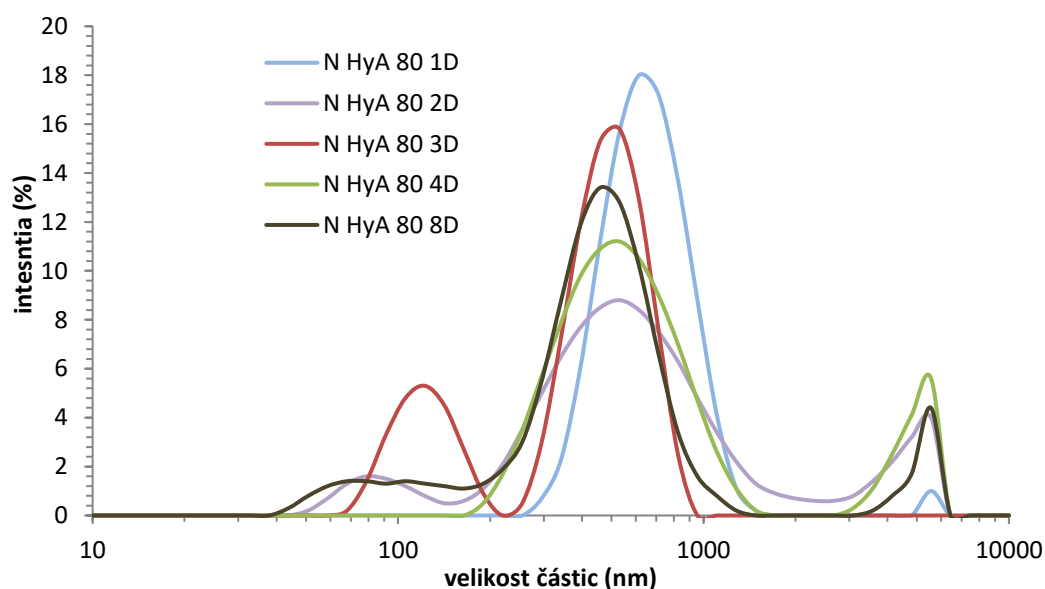
Byly proměřeny různé koncentrace nízkomolekulárního hyaluronanu (HyA_a) v boritém prostředí po dobu 8 dní. Tabulka 12 zobrazuje vývoj polohy naměřených píků a jejich plochu v průběhu času. Z tabulky i následujícího grafu je patrné, že velikost hyaluronových řetězců se ve většině případů výrazně nezměnila. Ve většině případů došlo k zvýšení rozptylu polohy píků a jejich plochy v průběhu času. U některých měření můžeme vidět, že velikost hlavního píku se pohybovala okolo 2000nm a výše. To by mohlo být způsobeno například prachovou částicí, které se dostala do vzorku z okolního prostředí.

Tabulka 12: Měření velikosti částic boritého roztoku s HyA_a po dobu 8 dní

čas	počet píků	pík [nm]	plocha [%]	pík [nm]	plocha [%]	pík [nm]	plocha [%]	kvalita měření
HyA a 30								
1d	2			743	74.8	4237	25	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
2d	1					1947	100	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
3d	3	152	26.6	615	73.4			Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
4d	3	59.2	0.5	513	51	3827	48	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
8d	3	79.9	4.5	555	58.5	4420	37	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
HyA a 60								
1d		68.3	8	498.4	86	4910	6	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
2d		98.4	6	621.7	70.8	4695	22.8	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
3d		87.9	19	422.4	81			Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
4d				497.9	98	5560	2	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
8d		71.1	1	292.6	37	3603	62	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
HyA a 80								
1d				667.7	99	5560	1	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
2d		89.7	8	622.7	79.5	4467	12.7	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
3d		122.9	23	508.1	77			Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
4d				559.5	86.4	4851	13.6	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
8d		123.1	10	489.7	80.5	5155	13	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.

HyA a 140								
1d	3	134.8	16.5	746.8	75.5	4797	8	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
2d	3	32.6	2	424.5	94	5375	4	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
3d	3	113.1	16.5	750.6	73.5	4567	10	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
4d	2			234.7	75.7	2429	24.3	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
8d	3	64.9	9	456.9	81	5212	10	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.

V přiloženém grafu můžeme vidět grafické znázornění změny velikosti částic ve vzorku hyaluronanu s přidavkem 80 μ l/10 ml.



Obrázek 14: Velikost částic nízkomolekulárního HyA

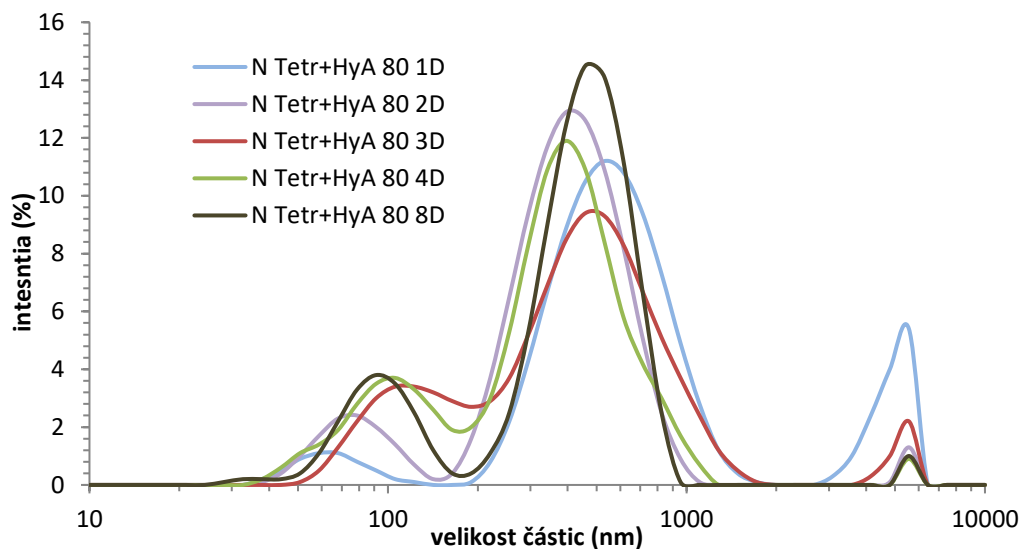
5.4.2 Roztok tetryzolinu s HyA_a

Byly proměřeny různé koncentrace nízkomolekulárního hyaluronanu (HyA_a) v roztoku tetryzolinu (Tetr) v průběhu 8 dní. Tabulka 13 i následujícího graf zobrazují, že velikost hyaluronových řetězců se v průběhu času výrazně nezměnila.

Tabulka 13: Měření velikosti částic roztoku tetryzolinu s HyA_a po dobu 8 dní

	počet píků	pík [nm]	plocha [%]	pík [nm]	plocha [%]	pík [nm]	plocha [%]	kvalita měření
Tetr + HyA a 30								
1d	2			607.2	96	5197	5	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
2d	2			494.3	93	5197	7	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
3d	3	84.3	9	559.6	77.9	4944	13.1	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
4d	3	120.3	39.4	561.8	54.6	5138	6	Dobrá.
8d	3	117.8	21.5	547.8	76.5	5518	2	Dobrá.
Tetr + HyA a 60								
1d	2	46.1	2	425.2	81.5	5055	16.5	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
2d	2	87.0	11.4	611.4	75.6	5169	13	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
3d	3	90.5	9	562.4	82	4889	9	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
4d	3	125.3	18.5	712.5	70.5	4716	11	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
8d	3	97.8	12	641.7	78	5185	10	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
Tetr + HyA a 80								
1d	3	66.3	5	588.9	81.5	4857	13.1	Přítomnost velkých či sedimentujících částic
2d	3	78.9	12.1	438.7	86.6	5530	1	Přítomnost velkých či sedimentujících částic
3d	3	123.0	22	540.1	75	5207	3	Přítomnost velkých či sedimentujících částic
4d	3	100.7	22.5	442.2	76.5	5560	1	Přítomnost velkých či sedimentujících částic
8d	3	93.2	19.2	480.3	79.9	5560	1	Přítomnost velkých či sedimentujících částic
Tetr + HyA a 140								
1d	2			768.7	97	5156	3	Přítomnost velkých či sedimentujících částic
2d	3	112.2	28.1	428	68.9	5222	3	Přítomnost velkých či sedimentujících částic
3d	3	60.4	5.6	588	68.4	4333	26	Přítomnost velkých či sedimentujících částic
4d	2			597.3	77.4	4591	22.6	Přítomnost velkých či sedimentujících částic
8d	3	93.8	11.4	713.9	77.2	5162	11.4	Přítomnost velkých či sedimentujících částic

U těchto vzorků v průběhu času docházelo k výskytu také kratších řetězců. Převážně se však většina částic pohybovala okolo 500-800 nm. Následující graf zobrazuje grafické znázornění změny velikosti u vzorku tetryzolinu s přídavkem hyaluronanu 80 µl/10 ml.



Obrázek 15: Velikost částic v systému tetryzolinu s přídavkem HyA

5.4.3 Roztok benzalkonia chloridu s HyA_a

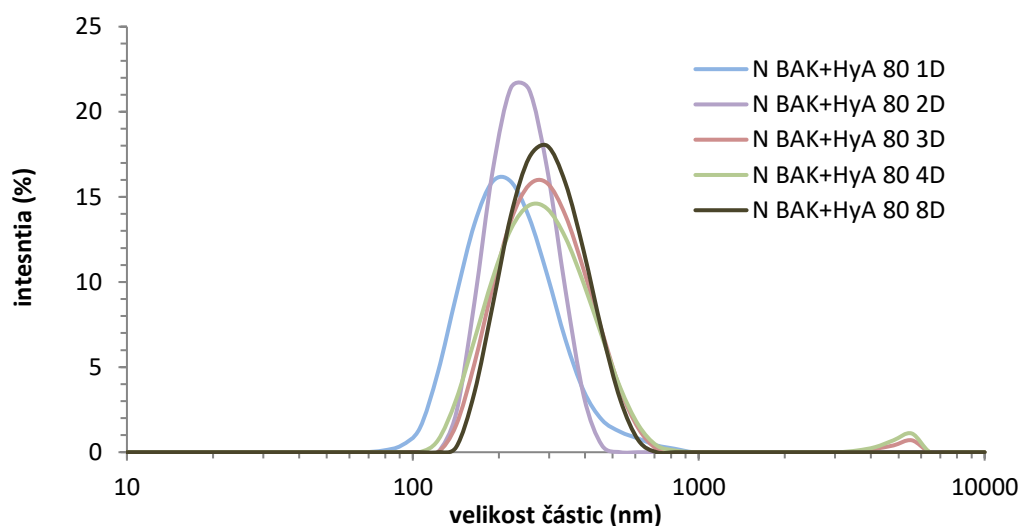
Tabulka 14 znázorňuje změny velikosti částic nízkomolekulárního hyaluronanu (HyA_a) v boritém roztoku s benzalkonium chloridem (BAK), v průběhu 8 dní. U toho vzorku můžeme velmi hezky pozorovat, že s časovým odstupem se velikost částic zvětšuje, což by naznačovalo agregaci vzorku. Všechna vyhodnocená data jsou si stále velmi podobná a nedochází k velkému rozptylu velikostí.

Tabulka 14: Měření velikosti částic roztoku BAK s HyA_a po dobu 8 dní

	počet píků	pík [nm]	plocha [%]	pík [nm]	plocha [%]	kvalita měření
BAK + HyA a 30						
1d	1	190.5	100			Dobrá
2d	1	246.8	100			Dobrá
3d	1	244.1	100			Dobrá
4d	2	260.1	99.4	5174	0.6	Dobrá
8d	2	286.8	98.6	5095	1.4	Dobrá
BAK + HyA a 60						
1d	2	299.8	98.1	4642	1.9	Dobrá
2d	2	309.5	99.4	5256	0.6	Dobrá
3d	2	325.8	98.7	5201	1.3	Dobrá
4d	2	346.6	97.8	5200	2.2	Dobrá
8d	2	502.9	95.6	4831	4.4	Dobrá

BAK + HyA a 80						
1d	1	235.3	100			Dobrá
2d	1	246.6	100			Dobrá
3d	2	302.6	98.6	5054	1.4	Dobrá
4d	2	297.5	97.8	4990	2.2	Dobrá
8d	1	303.9	100			Dobrá
BAK + HyA a 140						
1d	1	109.4	100			Dobrá
2d	1	151.6	100			Dobrá
3d	1	182.4	100			Dobrá
4d	1	192.3	100			Dobrá
8d	1	188.9	100			Dobrá

V přiloženém grafu můžeme vidět grafické znázornění změny velikosti u vzorku benzalkonia chloridu s přidavkem hyaluronanu 80 μ l/10 ml.



Obrázek 16: Velikost částic v systému benzalkonia chloridu s HyA

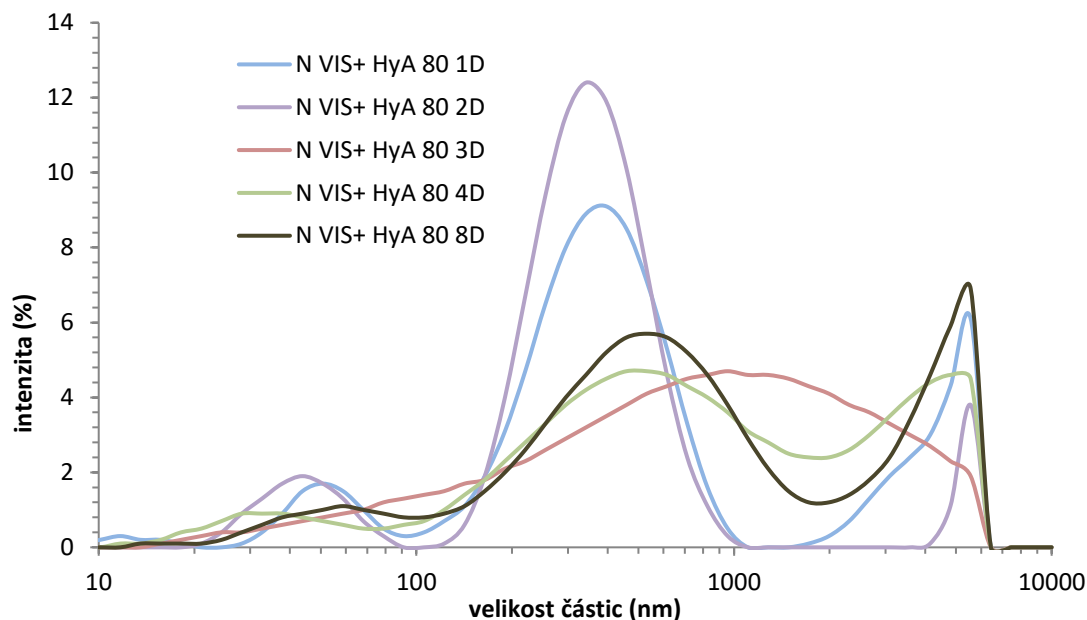
5.4.4 Oční kapky VISINE s HyA_a

Tabulka 15 poskytuje přehled změn velikosti částic nízkomolekulárního hyaluronanu (HyA_a) v očních kapkách VISINE (VIS) v průběhu 8 dní. V následujícím grafu můžeme vidět grafické znázornění změny velikosti u vzorku VISINu s přidavkem hyaluronanu 80 μ l/10 ml. Z tabulky i grafu je patrné, že v systému se vyskytovalo velké množství různě velkých částic, zejména s odstupem pár dní od namíchání, které již nemusely být správně zachyceny touto metodou.

Tabulka 15: Měření velikosti částic kapek VISINE s HyA_a po dobu 8 dní

	počet píků	pík [nm]	plocha [%]	pík [nm]	plocha [%]	pík [nm]	plocha [%]	Kvalita měření
VIS+ HyA a 30								
1d	3	46.2	2	358.4	82.5	5004	15.5	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
2d	3	1	4	359.4	59.6	4549	33.6	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
3d	2	110.8	3	583.1	97			Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
4d	3	62.1	8	339.8	88	5325	4	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
8d	3	60.4	5	353.8	89	5265	6	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
VIS+ HyA a 60								
1d	1			1048	100			Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
2d	3	65.8	15	553.6	76	5030	9	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
3d	3	0.9	7	444.4	76	4228	17	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
4d	2	0.7	3	1374	97			Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
8d	3	47.3	3	762.9	76.2	4686	20.8	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
VIS+ HyA a 80								
1d	3	53.8	9	394.8	71	4342	20	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
2d	3	45.1	10.5	374.9	84.5	5355	5	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
3d	1					1295	100	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
4d	3	39.7	8	615.1	62	3610	30	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
8d	3	59.3	9	610.6	64	4190	27	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
VIS+ HyA a 140								
1d	3	44.7	4	613.4	74.9	3635	21.1	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
2d	3	53.2	10.6	628.7	66.9	3731	22.5	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
3d	1					1051	100	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
4d	3	60.5	11.9	526	54.2	3795	33.9	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
8d	3	61.8	15.1	448.8	68.1	4605	16.8	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.

V přiloženém grafu můžeme vidět grafické znázornění změny velikosti u vzorku VISINu s přídatkem hyaluronanu 80 $\mu\text{l}/10\text{ ml}$. Z tabulky i grafu je patrné, že v systému se vyskytovalo velké množství různě velkých částic, zejména s odstupem pár dní od namíchání, které již nemusely být správně zachyceny touto metodou.



Obrázek 17: Velikost částic v systému očních kapek VISINE a HyA

5.4.5 Oční kapky Opthalgo–Septonex s HyA_a

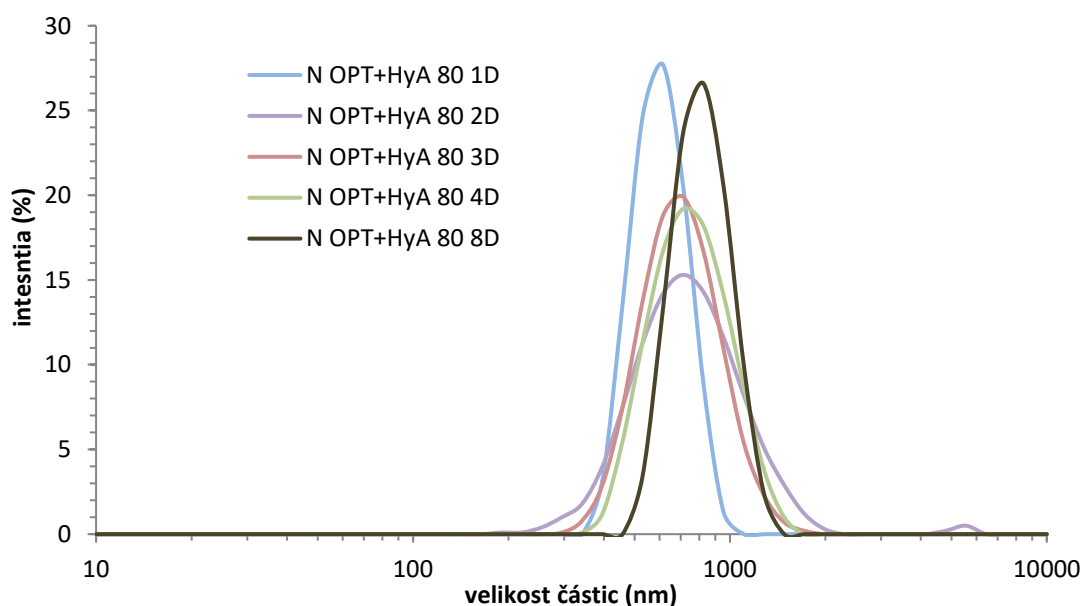
Byly proměřeny různé koncentrace nízkomolekulárního hyaluronanu (HyA_a) v prostředí očních kapek Opthalgo–Septonex (OPT) v průběhu 8 dní. Tabulka 16 poskytuje vyhodnocená data.

Tabulka 16: Měření velikosti částic kapek OPT s HyA_a po dobu 8 dní

	počet píků	pík [nm]	plocha [%]	pík [nm]	plocha [%]	Kvalita měření
OPT+ HyA a 30						
1d	2	395.2	95	4939	5	Měření blízko hranici kvality.
2d	1	564.9	100			Měření blízko hranici kvality.
3d	1	699.1	100			Měření blízko hranici kvality.
4d	2	635	99	5319	1	Měření blízko hranici kvality.
8d	2	785.9	99	5450	1	Měření blízko hranici kvality.
OPT+ HyA a 60						
1d	2	623.1	99	4830	1	Měření blízko hranici kvality.
2d	2	639.5	99	5368	1	Měření blízko hranici kvality.
3d	1	939.5	100			Měření blízko hranici kvality.
4d	2	785.4	99	5474	1	Měření blízko hranici kvality.
8d	2	954.7	97	5119	3	Měření blízko hranici kvality.

OPT+ HyA a 80						
1d	1	609.3	100	5389	0.7	Měření blízko hranici kvality.
2d	2	776.5	99.3			Měření blízko hranici kvality.
3d	1	724.7	100			Měření blízko hranici kvality.
4d	1	775.9	100			Měření blízko hranici kvality.
8d	1	825.9	100			Měření blízko hranici kvality.
OPT+ HyA a 140						
1d	1	548	100	5438	0.4	Měření blízko hranici kvality.
2d	2	751.9	99.6			Měření blízko hranici kvality.
3d	1	894.6	100			Měření blízko hranici kvality.
4d	1	837.4	100			Měření blízko hranici kvality.
8d	1	1015	100			Měření blízko hranici kvality.

Také u toho měření můžeme vidět hezky štíhlé a souměrné píky, z čehož můžeme usuzovat, že v systému se vyskytují částice stejné velikosti. V průběhu času došlo k malému posunu hlavního píku čili velikosti částic. V následujícím grafu můžeme vidět grafické znázornění změny velikosti u vzorku Ophthalmo–Septonexu s přídatkem hyaluronanu 80 µl/10 ml.



Obrázek 18: Velikost částic v systému očních kapek *Ophthalmo-Septonex a HyA*

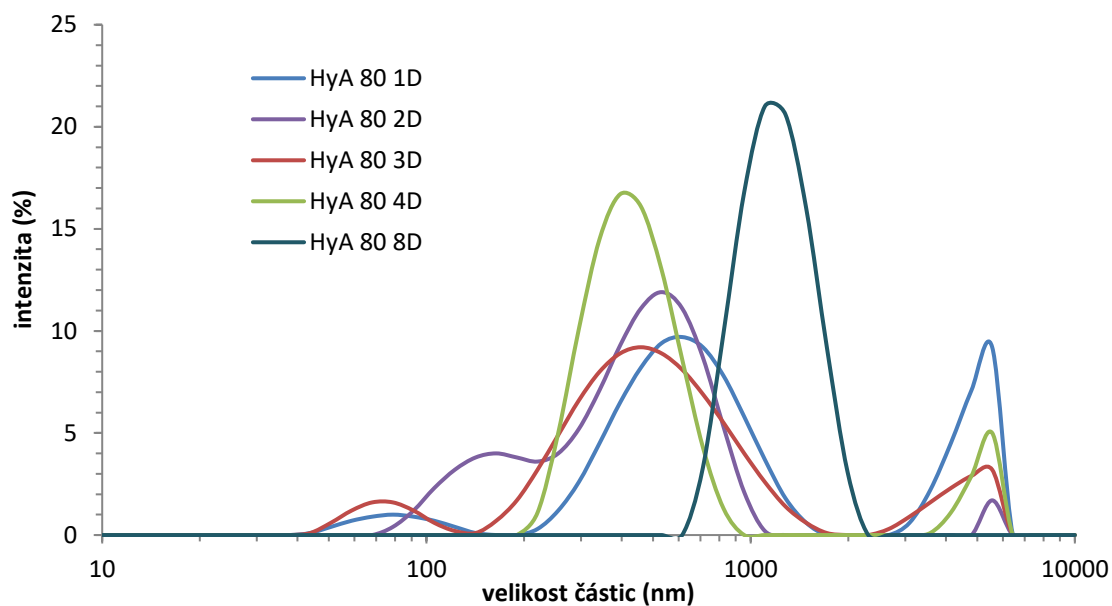
5.4.6 Boritý roztok s HyA_b

Byly proměřeny různé koncentrace vysokomolekulárního hyaluronanu (HyA_b) v boritém prostředí v průběhu 8 dní. Tabulka 17 zobrazuje přehled vývoje velikosti částic.

Tabulka 17: Měření velikosti částic boritého roztoku s HyA_b po dobu 8 dní

	píky	pík [nm]	plocha [%]	pík [nm]	plocha [%]	pík [nm]	plocha [%]	Kvalita měření
HyA _b 30								
1d	2	103.7	22.8	385.9	77.2			Dobrá
2d	2	97.58	15.8	418.2	84.2			Dobrá
3d	2	98.49	23.9	392.9	76.1			Dobrá
4d	2	666.2	10.7	4978	89.3			Dobrá
8d	3	139.6	23	659.5	74	5401	3	Dobrá
HyA _b 60								
1d	2	53.9	14.7	245.2	85.3			Dobrá
2d				550.2	100			Dobrá
3d		173.7	17.8	767.8	79.2	5560	3	Dobrá
4d		88.8	12.8	713.1	78.2	5011	9	Dobrá
8d		113.1	13.3	548.2	77.7	5052	9	Dobrá
HyA _b 80								
1d	3	81.6	5	642.1	71.4	4815	23.6	Dobrá
2d	3	156.6	21.5	508.9	76.9	5560	2	Dobrá
3d	3	76.8	7	535.4	81.8	4509	11.2	Dobrá
4d	2			438.6	91	5122	9	Dobrá
8d	1			1220	100			Dobrá
HyA _b 140								
1d	2			858.1	93	5393	7	Přítomnost velkých či sedimentujících částic
2d	3	72.0	9	709.2	80.8	5129	10.2	Přítomnost velkých či sedimentujících částic
3d	3	74.1	7	844.2	74.6	3916	18.4	Přítomnost velkých či sedimentujících částic
4d	3	83.2	11.5	645.9	73.7	5294	14.8	Přítomnost velkých či sedimentujících částic
8d	1			864.2	100			Přítomnost velkých či sedimentujících částic

Také zde můžeme pozorovat ve většině případů slabý nárůst velikosti s časovým odstupem. V přiloženém grafu je grafické znázornění změny velikosti u vzorku vysokomolekulárního hyaluronanu 80 µl/10 ml.



Obrázek 19: Velikost částic v roztoku hyaluronanu

5.4.7 Roztok tetrazolinu s HyA_b

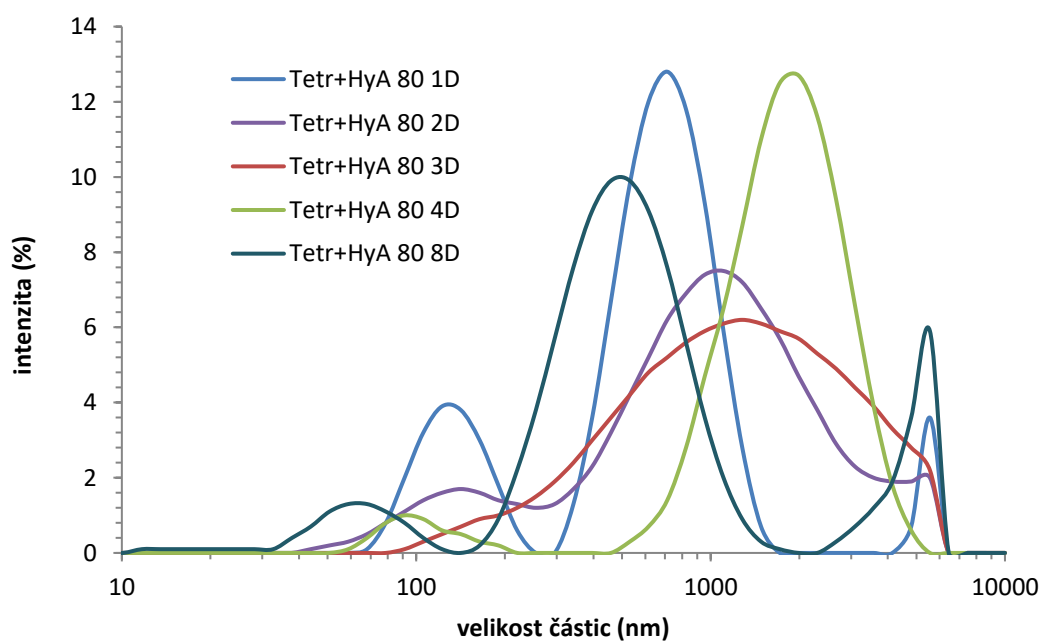
Tabulka 18 zobrazuje přehled změn velikosti částic vysokomolekulárního hyaluronanu (HyA_b) v boritém roztoku s tetrazolinem (Tetr) v průběhu 8 dní.

Tabulka 18: Měření velikosti částic roztoku tetrazolinu s HyA_b po dobu 8 dní

	počet píků	pík [nm]	plocha [%]	pík [nm]	plocha [%]	pík [nm]	plocha [%]	Kvalita měření
Tetr + HyA b 30								
1d	3	112.1	11.2	704.1	79.8	5040	9	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
2d	3	110.1	7	695.2	77.4	4537	15.6	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
3d	3	100.7	8	745.3	91.4	5055	0.6	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
4d	3	108.6	16.7	591.1	81.3	5479	2	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
8d	3	66.3	11.3	373.7	87.8	5560	0.9	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
Tetr + HyA b 60								
1d	3	102	12.6	608.2	86.6	5560	0.8	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
2d	3	66.4	6	541.3	88	5381	6	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
3d	3	108.2	5	823.1	82.1	4886	12.9	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
4d	3	86.7	11.9	437.3	85.5	5560	2.5	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
8d	3	60.1	2	569.2	86.2	5178	11.8	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.

Tetr + HyA b 80								Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
1d	3	134.4	19.1	734.7	76.9	5430	4	
2d	3	147	12.8	1321	82.2	4853	5	
3d	1			1623	100			
4d	2	107.5	4	1960	96			
8d	3	65.41	7	539.2	79.5	4794	13.5	
Tetr + HyA b 140								Měření blízko hranici kvality.
1d	3	93.44	9	777.4	85	5066	6	
2d	3	77.69	6	649	73.4	4134	20.6	
3d	2	94.8	7			2170	93	
4d	2	116.8	28.8	383.9	71.2			
8d	3	39.82	3	109.6	18	330.4	79	

Z naměřených dat můžeme vidět, že vzorek byl velmi polydisperzní a velikost se měnila nahodilým způsobem. Následující graf znázorňuje grafické znázornění změny velikosti u vzorku vysokomolekulárního hyaluronanu 80 µl/10 ml v roztoku tetrazolinu.



Obrázek 20: Velikost částic v systému tetrazolinu s HyA

5.4.8 Roztok benzalkonia chloridu s HyA_b

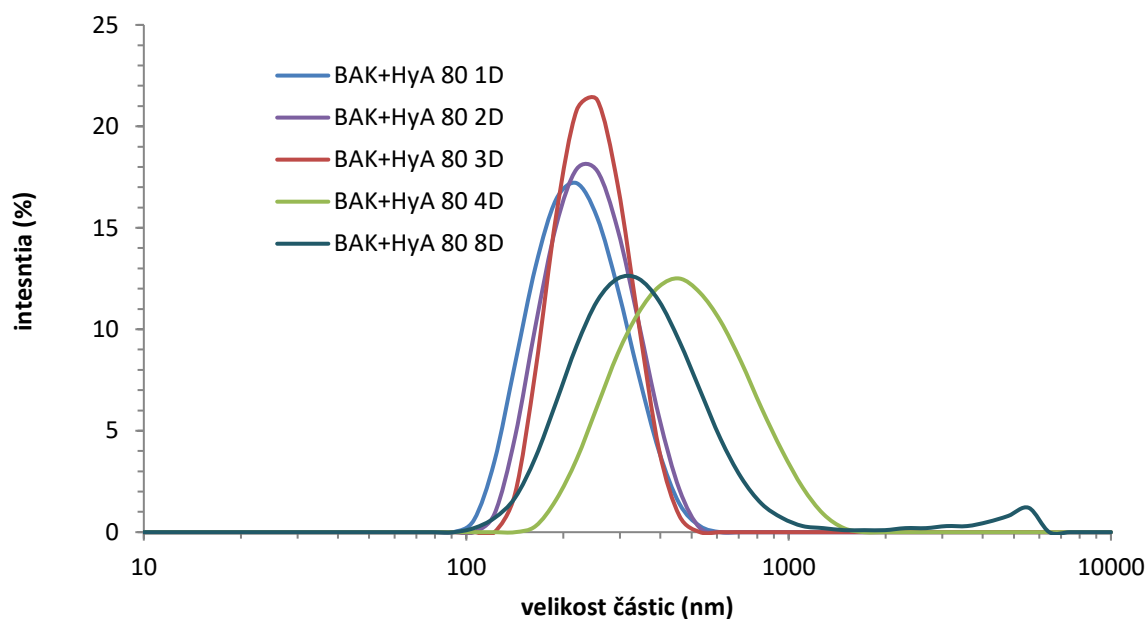
Tabulka 19 zobrazuje přehled změn velikosti částic vysokomolekulárního hyaluronanu (HyA_b) v boritém roztoku s benzalkonium chloridem (BAK) v průběhu 8 dnů. Podobně jako u nízkomolekulárního hyaluronanu můžeme u tohoto vzorku velmi hezky pozorovat, že s časovým odstupem se velikost částic zvětšuje. Z toho bychom mohli usuzovat, že ve vzorku dochází k agregaci.

Tabulka 19: Měření velikosti částic roztoku BAK s HyA_b po dobu 8 dní

píky	pík [nm]	plocha [%]	pík [nm]	plocha [%]	pík [nm]	plocha [%]	Kvalita měření
BAK + HyA b 30							
1d	2		727.5	99.4	5469	0.6	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
2d	2		817.1	95	5219	5	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
3d	2		882.7	75.9	4507	24.1	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
4d	1		1388	100			Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
8d	2		966.4	48.6	4192	51.4	Přítomnost velkých či sedimentujících částic.
BAK + HyA b 60							
1d	2		487.5	99	5006	1	Měření blízko hranici kvality.
2d	2		865.5	96	5246	4	Měření blízko hranici kvality.
3d	2		613	98	5195	2	Měření blízko hranici kvality.
4d	2		606.8	99.3	5401	0.7	Měření blízko hranici kvality.
8d	2		787.8	99.6	5560	0.4	Měření blízko hranici kvality.
BAK + HyA b 80							
1d	1		232.4	100			Měření blízko hranici kvality.
2d	1		251.1	100			Měření blízko hranici kvality.
3d	1		251.7	100			Měření blízko hranici kvality.
4d	1		510.6	100			Měření blízko hranici kvality.
8d	1		364.9	96	4327	4	Měření blízko hranici kvality.

BAK + HyA b 140								
1d	2			201.8	97	4665	3	Měření blízko hranici kvality.
2d	1			141	100			Měření blízko hranici kvality.
3d	2			163.1	97	4667	3	Měření blízko hranici kvality.
4d	3	48.9	0.4	253.8	97.6	4518	2	Měření blízko hranici kvality.
8d	2			218.1	99.6	5020	0.4	Měření blízko hranici kvality.

Z tabulky je patrné, že v systému se vyskytují částice podobných velikostí s časovým odstupem. Stejně jako u nízkomolekulárního hyaluronanu, došlo v těchto systémech k mírnému zvětšení velikosti. Na obrázku 21 můžeme vidět grafické znázornění změn velikosti u vzorku s vysokomolekulárním hyaluronanem o koncentraci 80 $\mu\text{l}/10\text{ ml}$ v roztoku benzalkonia chloridu.



Obrázek 21: Velikost částic v systému benzalkonia chloridu s HyA

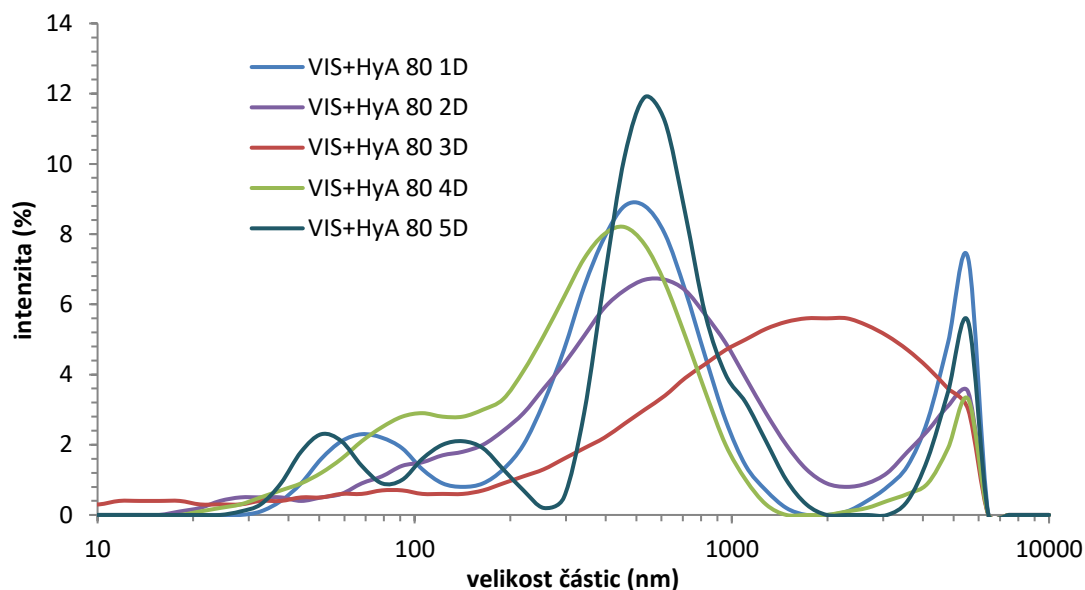
5.4.9 Oční kapky VISINE a HyA_b

V tabulce 20 můžeme vidět vyhodnocená data z měření velikostí částic vysokomolekulárního hyaluronanu (HyA_b) v očních kapkách VISINE (VIS) v průběhu 8 dní. Také u tohoto systému můžeme vidět, že vzorek vykazoval vysokou polydisperzitu. Některé částice by již nemusely být správně zachyceny touto metodou.

Tabulka 20: Měření velikosti částic kapek VISINE s HyA_b po dobu 8 dní

	počet píků	pík [nm]	plocha [%]	pík [nm]	plocha [%]	pík [nm]	plocha [%]	Kvalita měření
VIS + HyA b 30								
1d	3	58.3	10.2	387.5	86.8	5434	3	Přítomnost velkých či sedimentujících částic
2d	3	35.2	3	442	77	4656	20	Přítomnost velkých či sedimentujících částic
3d	3	31.6	7	336.2	85	5320	8	Přítomnost velkých či sedimentujících částic
4d	2			755.5	96	4634	4	Přítomnost velkých či sedimentujících částic
8d	3	86.8	3	536.4	77.3	4604	19.7	Přítomnost velkých či sedimentujících částic
VIS + HyA b 60								
1d	3	53.8	5	444.9	75.5	4091	19.5	Měření blízko hranici kvality.
2d	3	75.9	10.9	567.7	78.3	4667	10.8	Měření blízko hranici kvality.
3d	2			731	83	4318	17	Měření blízko hranici kvality.
4d	3	90.7	6	715.7	76.3	4513	17.7	Měření blízko hranici kvality.
8d	3	84.6	14	629.4	75.7	4983	10.3	Měření blízko hranici kvality.
VIS + HyA b 80								
1d	3	77.8	14.4	518.5	68.2	4783	17.3	Měření blízko hranici kvality.
2d	3	31.9	3	591.8	83.9	4290	13.1	Měření blízko hranici kvality.
3d	3	66.5	12.2	592.8	72.7	4406	15.1	Příliš polydisperzní vzorek.
4d	3	88.8	20.7	445.8	72.1	4764	7.2	Příliš polydisperzní vzorek.
8d	3	140.0	11.8	650.4	77.4	5046	10.8	Příliš polydisperzní vzorek.
VIS + HyA b 140								
1d	3	43	11.7	344.1	82.6	5114	5.6	Příliš polydisperzní vzorek.
2d	3	69.8	13.8	490	71.2	4756	15	Příliš polydisperzní vzorek.
3d	3	65.8	7	477.3	65.7	4211	26	Příliš polydisperzní vzorek.
4d	3	109.3	16.8	1201	59.5	4463	23.7	Příliš polydisperzní vzorek.
8d	2			804.6	96	4843	4	Příliš polydisperzní vzorek.

V přiloženém grafu můžeme vidět grafické znázornění změny velikosti u vzorku vysokomolekulárního hyaluronanu o koncentraci 80 μ l/10 ml v očních kapkách VISINE.



Obrázek 22: Velikost částic v systému očních kapek VISINE a HyA

5.4.10 Oční kapky Opthalgo–Septonex s HyA_b

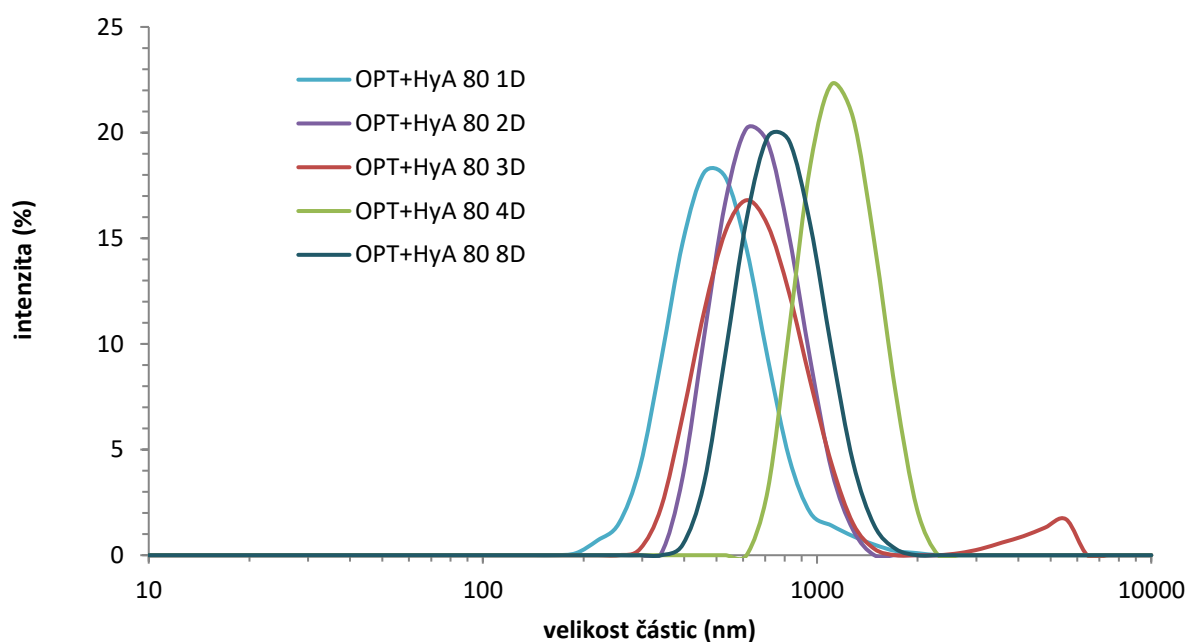
V tabulce 21 můžeme vidět přehled změn velikosti částic kyseliny hyaluronové v očních kapkách Opthalgo–Septonex (OPT) s různými přísadami vysokomolekulárního hyaluronanu (HyA_b) v průběhu 8 dnů.

Tabulka 21: Měření velikosti částic kapek OPT s HyA_b po dobu 8 dní

	počet píků	pík [nm]	plocha [%]	pík [nm]	plocha [%]	pík [nm]	plocha [%]	kvalita měření
OPT + HyA b 30								
1d	2			621.7	89.7	5199	10.3	Měření blízko hranici kvality.
2d	1			815.3	100			Měření blízko hranici kvality.
3d	3	126.2	5	560.1	94	4790	1	Měření blízko hranici kvality.
4d	2			861.4	99.2	5541	0.8	Měření blízko hranici kvality.
8d	1			638.4	100			Měření blízko hranici kvality.
OPT + HyA b 60								
1d	1	537.5	100					Měření blízko hranici kvality.
2d	1	791.8	100					Měření blízko hranici kvality.
3d	2	668	95	4628	5			Měření blízko hranici kvality.
4d	2	851.2	99	5555	1			Měření blízko hranici kvality.
8d	1	885.6	100					Měření blízko hranici kvality.
OPT + HyA b 80								
1d	1	538.1	100					Měření blízko hranici kvality.
2d	1	686.4	100					Měření blízko hranici kvality.
3d	1	770.1	100					Měření blízko hranici kvality.
4d	1	831.4	100					Měření blízko hranici kvality.
8d	1	806.1	100					Měření blízko hranici kvality.

OPT + HyA b 140						
1d	1	602.3	100			Měření blízko hranici kvality.
2d	2	776.4	99.3	5559	0.7	Měření blízko hranici kvality.
3d	1	809.3	100			Měření blízko hranici kvality.
4d	2	1125	99.7	5560	0.3	Vzorek příliš polydisperzní.
8d	1	868.2	100			Vzorek příliš polydisperzní.

Z tabulky můžeme usoudit, že velikost částic se s časem mírně zvětšila. Systém OPT+HyA vykazoval nižší polydisperzitu ve srovnání s očními kapkami VISINE (VIS+HyA). Velikost částic hlavního píku se pohybovala v rozmezí 500–1200 nm. Následující graf znázorňuje změny velikosti u vzorku vysokomolekulárního hyaluronanu o koncentraci 80 µl/10 ml v očních kapkách VISINE.



Obrázek 23: Velikost částic systému očních kapek *Opthalgo-Septonex a HyA*

5.4.11 Závěr DLS

Z vyhodnocených výsledků můžeme usuzovat, že na hyaluronovém řetězci dochází k různým přitažlivým či odpudivým interakcím v průběhu času. Avšak tyto změny nejsou natolik výraznými a jednoznačnými, abychom je mohli s jistotou přiřadit k interakcím řetězců hyaluronanu v různých prostředích. Měření také mohlo být zkresleno například prachovými částicemi v okolním prostředí. Pro lepší interpretaci dat bychom museli zvýšit koncentraci hyaluronanu. Pokud bychom chtěli zachovat možnost aplikace očních kapek na oční povrch, není možné rapidně zvýšit koncentraci hyaluronanu, aniž by došlo k zákalu. V roztoku dochází patrně k interakcím a agregacím opačně nabitých složek. Lze říci, že velikost částic se mění, bohužel však nevykazuje jednoznačný trend, který by vysvětloval vizuální pozorování.

5.5 Dlouhodobé sledování vybraných systémů

Systémy očních kapek s přidavkem 80 $\mu\text{l}/10\text{ml}$ a 140 $\mu\text{l}/10\text{ml}$ byly vybrány pro sledování po dobu jednoho měsíce. Vzorky připravené podle odstavce 4.3.3 byly proměřeny po namíchání a následně v týdenních intervalech po dobu 1 měsíce. V tabulce 22 jsou zobrazeny hodnoty zeta potenciálu vybraných systémů.

Tabulka 22: Dlouhodobé sledování zeta potenciálu vybraných systémů

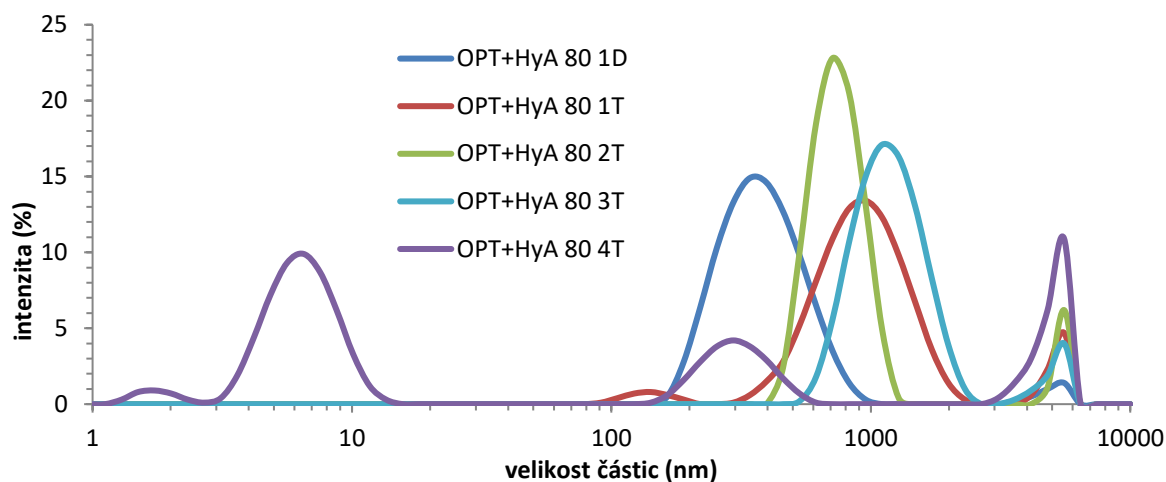
vzorek/čas	po namíchání	po 1 týdnu	po 2 týdnech	po 3 týdnech	po 4 týdnech
OPT+HyA 80	12.9	9.2	9.1	8.1	7.2
OPT+HyA 140	12.7	12.1	9.9	8.5	9.0
VIS+HyA 80	-24.3	-25.4	-27.9	-23.4	-24.3
VIS+HyA 140	-22.2	-26.6	-22.1	-23.7	-24.7

Z přiložené tabulky můžeme vidět, že zeta potenciál očních kapek Visine kolísá mnohem méně ve srovnání s očními kapkami Ophthalmo-Septonex. V tomto systému došlo ke snížení zeta potenciálu, což by mohlo naznačovat, že řetězce potřebují delší čas na tvorbu a ustálení vazeb. Tabulka 23 zobrazuje vyhodnocené výsledky měření velikosti částic. Velikost byla proměřena po namíchání systému (1d) a následně v týdenních intervalech (T).

Tabulka 23: Dlouhodobé sledování velikosti částic očních kapek Ophthalmo-Septonex

	píky	pík [nm]	plocha [%]	pík [nm]	plocha [%]	pík [nm]	plocha [%]	kvalita měření
Oční kapky Ophthalmo-Septonex s přidavkem 80 $\mu\text{l}/10\text{ml}$								
1d	2			395.9	96.9	4950	3.1	Měření blízko hranici kvality.
1T	3	140	2.9	969.9	89.5	5212	7.6	Měření blízko hranici kvality.
2T	2			749.8	92.7	5447	7.3	Přítomnost velkých či sedimentujících částic
3T	3	6.608	52.7	309	22.3	4973	21.9	Přítomnost velkých či sedimentujících částic
4T	2			1203	92.9	5107	7.1	Přítomnost velkých či sedimentujících částic
Oční kapky Ophthalmo-Septonex s přidavkem 140 $\mu\text{l}/10\text{ml}$								
1d	2			507.6	98.5	5116	1.5	Měření blízko hranici kvality.
1T	1			1113	100			Měření blízko hranici kvality.
2T	2			937.3	96.1	5370	3.9	Přítomnost velkých či sedimentujících částic
3T	2			295	91.8	4684	8.2	Přítomnost velkých či sedimentujících částic
4T	1			809.9	100			Přítomnost velkých či sedimentujících částic

Z vyhodnocených dat je zřejmé, že velikost částic se v čase mění. Můžeme pozorovat, že i počet píků není stálý, což znamená, že roztok je velmi polydisperzní. Převážně se však jedná o malé změny nejasného původu.



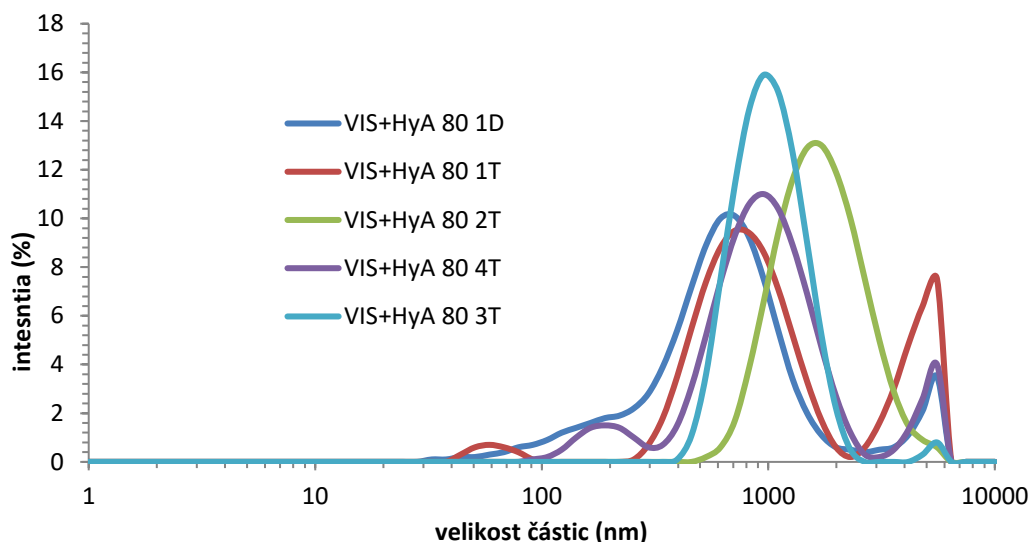
Obrázek 24: Znáznornění změny distribuce velikosti částic v systému OPT+HyA 80

V grafu z měření po 4 týdnech můžeme vidět poměrně velký pík okolo 6,8 nm. Tento pík pravděpodobně nenáleží zkoumanému systému. Bohužel nejde jednoznačně říci, čím byl výskyt tohoto píku způsoben. Mohlo by se jednat o prachovou částici z okolního prostředí. Tabulka 24 poskytuje vyhodnocené data měření velikostí částic systému očních kapek Visine s přísávkou hyaluronanu 80 $\mu\text{l}/10\text{ ml}$ a 140 $\mu\text{l}/10\text{ ml}$.

Tabulka 24: Dlouhodobé sledování velikosti částic očních kapek Visine

	píky	pík [nm]	plocha [%]	pík [nm]	plocha [%]	pík [nm]	plocha [%]	kvalita měření
Oční kapky Visine s přísávkou 80 $\mu\text{l}/10\text{ ml}$								
1d	2			665.8	91.8	4732	8.2	Měření blízko hranici kvality.
1T	3	62.2	2.8	828	73.2	4570	24	Měření blízko hranici kvality.
2T	1			1837	100			Přítomnost velkých či sedimentujících částic
3T	2			1045	99	5374	1	Přítomnost velkých či sedimentujících částic
4T	3	193.9	7.7	1018	83.8	4945	8.5	Přítomnost velkých či sedimentujících částic
Oční kapky Visine s přísávkou 140 $\mu\text{l}/10\text{ ml}$								
1D	2	200.2	16.8			2334	83.2	Měření blízko hranici kvality.
1T	2	137.9	11.2			1969	88.8	Měření blízko hranici kvality.
2T	3	134.3	15.6	1274	74.4	4605	10	Přítomnost velkých či sedimentujících částic
3T	3	120.2	14.4	833.2	83.9	5560	1.7	Přítomnost velkých či sedimentujících částic
4T	3	116.5	10.2	1138	77.3	4802	12.5	Přítomnost velkých či sedimentujících částic

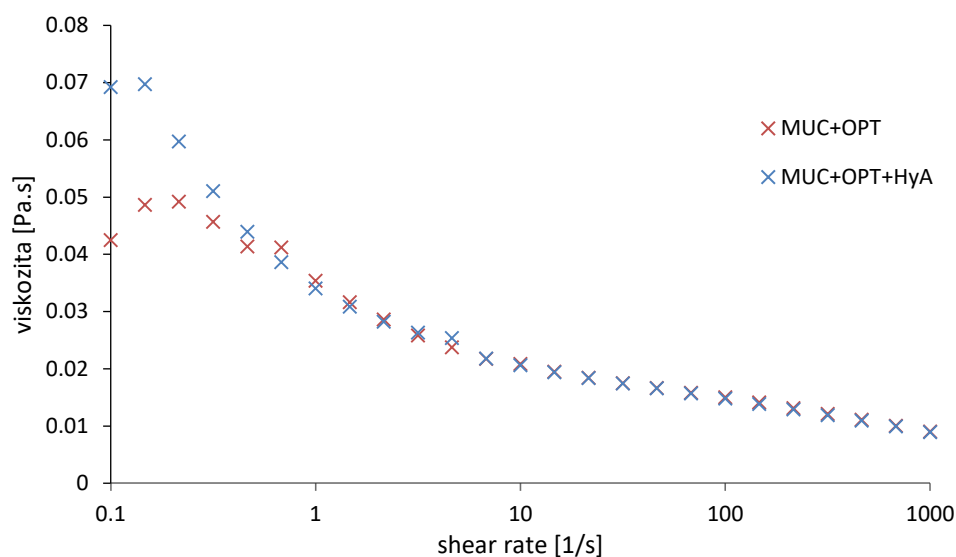
Tabulka 24 a přiložený graf zobrazují, že velikost částic se v čase měnila, ale jedná se, stejně jako ve vzorku s Ophthalmo-Septonexem, především o malé změny nejasného původu, které se pohybují oběma směry – k větším i menším částicím.



Obrázek 25: Znáznornění změny distribuce velikosti částic v systému VIS+HyA 80

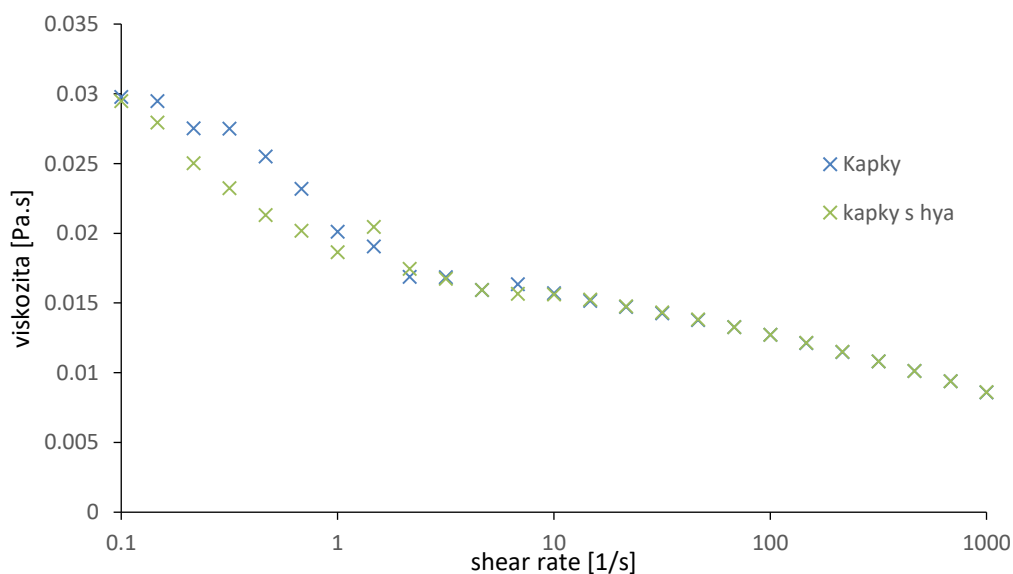
5.6 Reologické měření – mucinová metoda

Pro stanovení mukoadhezivního indexu bylo nutno proměřit viskozitu, potřebnou pro výpočet mukoadhezivního indexu. Byly vybrány systémy s nejvyšší stabilní koncentrací vysokomolekulárního hyaluronanu v kapkách. Tyto systémy byly smíchány s mucinem pro dosažení co nejdokonalejší simulace očního povrchu. Vzorky připravené dle kapitoly 4.3.4 byly měřeny na přístroji TA Instruments AR-G2 pomocí tokového testu double gap. Vzorky byly proměřeny dvakrát, na geometrii Standard size double concentric cylinders. Bylo použito zhruba 10 ml vzorku. Rozsah smykových rychlostí byl $0,1\text{--}1000\text{ s}^{-1}$ při teplotě 25°C . Dále byl nastaven logaritmický mód 6 bodů a povolená 5 % odchylka. Naměřené výsledky byly vyhodnoceny modelem Carreau.



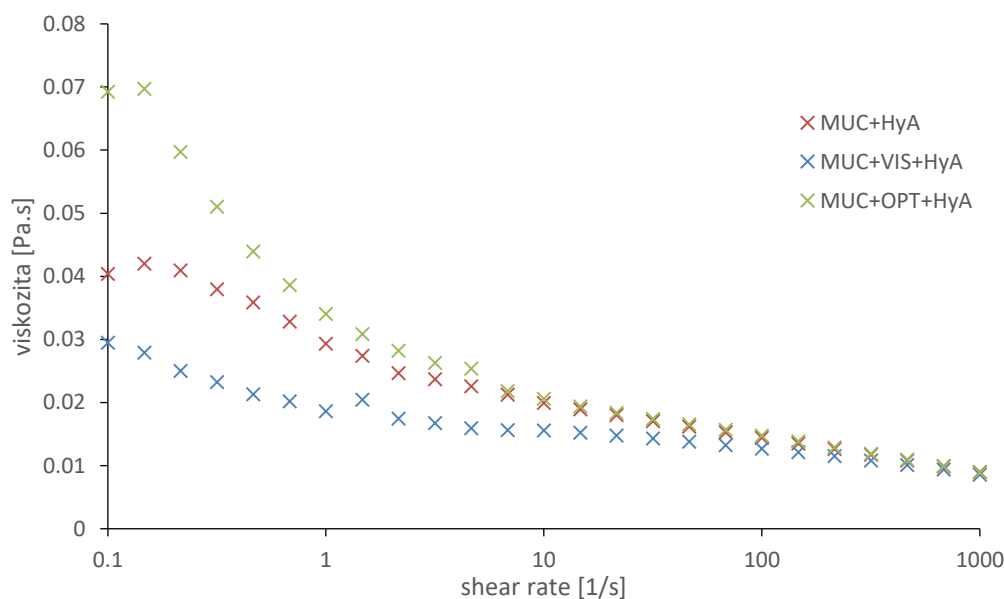
Obrázek 26: Porovnání viskozity systému po přidavku hyaluronanem

Obrázek 26 poskytuje grafické porovnání systému Ophthalmo-Septonexu s hyaluronanem a samotných očních kapek. Je patrné, že viskozita systému s přidavkem hyaluronanu je při nižších rychlostech vyšší ve srovnání se systémem bez přidavku. Z toho bychom mohli usuzovat, že hyaluronan s mucinem interaguje. Viditelný nárůst se však vyskytoval pouze při nízkých smykových rychlostech. Na obrázku 27 můžeme vidět porovnání systému očních kapek VISINE s přidavkem hyaluronanu. V tomto případě nedošlo k očekávanému a viditelnému zvýšení viskozity. To mohlo být způsobeno nedostatečnou časovou prodlevou mezi měřením a namícháním systému nebo příliš nízké koncentraci hyaluronanu.



Obrázek 27: Porovnání viskozit po přidavku hyaluronanu

Obrázek 28 zobrazuje porovnání viskozity mezi vybranými systémy s přidavkem hyaluronanu. Z obrázku je patrné, že v systému s očními kapkami Ophthalmo-Septonex došlo k nejvyššímu nárůstu viskozity po přidavku hyaluronanu, což by mohlo naznačovat vzájemné interakce mezi složkami systému a mucinem. U systému s očními kapkami VISINE došlo přidavkem hyaluronanu pravděpodobně k naředění systému, což by vysvětlovalo nižší viskozitu. Dále bychom mohli říct, že oproti systému MUC+OPT+HyA pravděpodobně nedochází u tohoto systému k žádoucím interakcím.



Obrázek 28: Porovnání viskozit v systémech s hyaluronanem

Z reologických testování můžeme vidět, že viskozita se zvýšila pouze u očních kapek Ophthalmo–Septonex a to pouze při nízké smykové rychlosti. Z tohoto můžeme usuzovat, že v systému se neustálily dostatečně silně vazby, které by nebyly při vyšších smykových rychlostech porušeny.

5.6.1 Výpočet mukoadhezivity pro oční kapky Ophthalmo–Septonex

Toto stanovení vychází z reologického měření viskozity. Mukoadhezitní index byl stanoven dle vzorce v kapitole 4.4.4. Systém očních kapek Ophthalmo–Septonex s hyaluronanem byl použit pro názorný výpočet mukoadhezitního indexu. V ostatních případech došlo pravděpodobně pouze ke snížení viskozity přidavkem roztoku hyaluronanu.

Tabulka 25: Výpočet mukoadhezivního indexu

smyková rychlost [1/s]	$\eta_{\text{MUC+OPT+HyA}}$	$\eta_{\text{MUC+OPT}}$	$\eta_{\text{bor+HyA}}$	$\Delta(\%)$
0,1000	0,0692	0,0424	0,0120	27,1
0,1467	0,0697	0,0486	0,0111	16,8
0,2154	0,0597	0,0492	0,0102	0,6

Mukoadhezivní index byl stanoven pouze pro nízké smykové rychlosti. Jelikož vycházíme z teorie, že mukoadhezita je důležitá zejména po nakápnutí očních kapek na oční povrch, jsou tyto hodnoty dostačující. Na obrázku 28 můžeme vidět, že při vysokých hodnotách smykových rychlostí se chovají všechny systémy stejně a viskozita všech systémů se snížila. Tím by mohlo být docíleno dobrého rozprostření na očním povrchu během mrknutí.

6 ZÁVĚR

Ve své práci, navazující na práci bakalářskou, jsem se zajímala studiem interakcí hyaluronanu s očními kapkami a jejich stability. Z vizuálního pozorování byla stanovena maximální koncentraci hyaluronanu, která je z dlouhodobého hlediska nejstabilnější. U mnoha systémů došlo k vysrážení řetězců z roztoku. Výskyt částic mohl být způsoben nedostatečně sterilním prostředím nebo příliš velkou koncentrací HyA. Při testovaném zvýšení koncentrace hyaluronanu v kapkách Ophthalmo-Septonex docházelo k zakalení roztoku. Zatímco u kapek VISINE byla pozorována větší koncentrace „chuchvalců“ viditelných v roztoku. Z měření velikosti částic a náboje můžeme usuzovat, že na hyaluronovém řetězci dochází k různým přitažlivým či odpudivým interakcím v průběhu času. Avšak tyto změny nejsou natolik výraznými a jednoznačnými, abychom je mohli s jistotou přiřadit interakcím řetězců hyaluronanu s různými prostředími. U vzorků s tetryzolinem nebo očními kapkami VISINE bylo zjištěno, že rozptyl velikostí částic je opravdu široký. Z čehož nelze s jistotou říct, co se ve vzorku v průběhu času děje. Naproti tomu vzorky s benzalkoniem chloridem nebo očními kapkami Ophthalmo-Septonex poskytovali hezky vykreslené píky a jejich polydisperzita byla znatelně nižší. S jistotou však můžeme říct, že velikost částic se mění a v různých prostředích se hyaluronové řetězce rozvinují a interagují rozdílně. Z reologického testování bylo zjištěno, že v případě VISINU je pravděpodobně koncentrace hyaluronanu ve vzorku příliš malá, z toho důvodu nebyl pozorován nárůst viskozity vzorku. To mohlo být také ovlivněno mnoha faktory jako je pH roztoku, čistota mucinu, ale také díky nedostatečný čas na interakce v roztoku. U vzorku s očními kapkami Ophthalmo-Septonex, kde je hlavní účinná látka kladně nabitá pravděpodobně došlo k interakcím s řetězci záporně nabitého hyaluronanu. V důsledku toho byl sledován nárůst viskozity oproti vzorku v boritém prostředí. U tohoto systému byl následně vypočítán mukoadhezivní index pro oblast nízkých smykových rychlostí. Proč došlo ke zvýšení viskozity pouze u očních kapek Ophthalmo-Septonex by mohlo být předmětem dalšího výzkumu.

Původní návrh vylepšení vlastností očních kapek, z hlediska mukoadhezivity a v důsledku toho delší zádrže kapek na očním povrchu nebyl jednoznačně potvrzen. Zejména při vizuálním sledování byla pozorována tvorba lehkého zákalu nebo vysrážení řetězců z roztoku i přes přítomnost opačně nabitých iontů v kapkách, a to i při nízkých koncentracích. Vysrážení částic z roztoku by vylučovalo možnost budoucí aplikace na oční povrch. Snížením přísad HyA do očních kapek bychom se mohli vyhnout nežádoucímu vysrážení. Avšak tyto koncentrace HyA by byly pravděpodobně již příliš nízké pro dosažení požadovaného prodloužení času setrvání léčiva na očním povrchu. Pro lepší pochopení interakcí hyaluronanu s očními kapkami VISINE i Ophthalmo-Septonex by bylo nutné dalšího výzkumu.

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- 1 Příbalový leták VISINE CLASSIC, Příbalový-leták.cz: přehledné informace o léčivech a doplňcích stravy [online], [cit, 2017-10-13], Dostupné z: <http://www.pribalovy-letak.cz/128-visine-classic>
- 2 Konttinen, Y, T.; Hayrinen-Immonen, R, H.; Nordstrom, D., et al, Innervation of Recurrent Aphthous Ulcers, Oral microbiology and immunology 1994, 9(1): 60-4
- 3 Tetrahydrozoline hydrochloride: European Pharmacopoeia (EP) Reference Standard, In: SIGMA-ALDRICH [online], [cit, 2017-10-27], Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/y0000460?lang=en&ion=CZ>
- 4 WOERTZ, Christina, Maren PREIS, Jörg BREITKREUTZ a Peter KLEINEBUDDE, Assessment of test methods evaluating mucoadhesive polymers and dosage forms: An overview, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2013, (85), 843-853, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.06.023>
- 5 S.K, Tilloo, T,M, Rasala, V,V, Kale, Mucoadhesive microparticulate drug delivery system, International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research 9 (2011) 52–56
- 6 Park, J.R, Robinson, Bioadhesive polymers as platforms for oral-controlled drug delivery: method to study bioadhesion, International Journal of Pharmaceutics 19 (1984) 107–127
- 7 Takeuchi, J, Thongborisute, Y, Matsui, H, Sugihara, H, Yamamoto, Y, Kawashima, Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems, Advanced Drug Delivery Reviews 57 (2005) 1583–1594
- 8 Hassan, J,M, Gallo, A simple rheological method for the in vitro assessment of mucin-polymer bioadhesive bond strength, Pharmaceutical Research 7 (1990) 491–495
- 9 K, Park, A new approach to study mucoadhesion: colloidal gold staining, International Journal of Pharmaceutics 53 (1989) 209–217
- 10 V, Ranga Rao, P, Buri, A novel in situ method to test polymers and coated microparticles for bioadhesion, International Journal of Pharmaceutics 52 (1989) 265–270
- 11 A, De Ascentiis, P, Colombo, N.A, Peppas, Screening of potentially mucoadhesive polymer microparticles in contact with rat intestinal mucosa, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 41 (1995) 229–234
- 12 C.L.C, Teng, N,F,H, Ho, Mechanistic studies in the simultaneous flow and adsorption of polymer-coated latex particles on intestinal mucus I: methods and physical model development, Journal of Controlled Release 6 (1987) 133–49
- 13 Biacore, In: Molecular Interaction Analysis, A Biacore Facility: Ernest Mario School of Pharmacy and the Biotech Center of Cook College [online], [cit, 2017-10-29], Dostupné z: <http://www.rci.rutgers.edu/~longhu/Biacore/MolecularInteractionAnalysis.html>
- 14 GOLDSTEIN, P, J, M, LIPMAN, a J, LUEBEHUSEN, A Controlled Clinical Trial of Two Local Agents in Postepisiotomy Pain and Discomfort, *Southern Medical Journal*,

- July 1977, vol, 70, no, 7, s, 806-808, ISSN 0038-4348 Wertz, P, W., Squier, C, A, Cellular and Molecular Basis of Barrier Function in Oral Epithelium, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 1991, 8(3): 237-269
- 15 IRMUKHAMETOVA, G.S., G, A, Mun, a V,V, Khutoryanskiy, Thiolated mucoadhesive and PEGylated nonmucoadhesive organosilica nanoparticles from 3 mercaptopropyltrimethoxysilane, *Langmuir*, 2011, vol, 27, no, 15, s, 9951–9556, ISSN 1520-5827,
 - 16 KHUTORYANSKIY, Vitaly V, Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers, *Macromolecular Bioscience*, June 2011, vol, 11, no, 6, s, 748-764, ISSN 1616-5187,
 - 17 LÁZNIČKA, Lukáš, 2014, Nežádoucí účinky léků na oko a jeho funkce, Praktické lékarenství: 177-179, Dostupné také z: www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2014/05/07.pdf
 - 18 FEUERMANNOVÁ, Alena, 2012, Oční symptomy alergika a jejich léčba, Interní medicína pro praxi: 165–168, Dostupné také z: www.internimedicina.cz/pdfs/int/2012/04/07.pdf
 - 19 By OpenStax College-Anatomy & Physiology, Connexions Web site, <http://cnx.org/content/col11496/1.6/>, Jun 19, 2013, CC BY 3,0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=30131227>
 - 20 HODGES, Robin R, a Darlene A, DARTT, Tear film mucins: Front line defenders of the ocular surface; comparison with airway and gastrointestinal tract mucins [online], [cit, 2018-01-16], DOI: 10,1016/j.exer,2013,07,027, ISBN 10,1016/j.exer,2013,07,027, Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014483513002376>
 - 21 Příbalový leták VISINE CLASSIC, Příbalový-leták.cz: přehledné informace o léčivech a doplňcích stravy [online], [cit, 2017-10-13], Dostupné z: <http://www.pribalovy-letak.cz/128-visine-classic>
 - 22 DE LA FUENTE, M, B SEIJO a M J ALONSO, Bioadhesive hyaluronan–chitosan nanoparticles can transport genes across the ocular mucosa and transfect ocular tissue, *Gene Therapy*, 2008, **15**(9), 668-676, DOI: 10,1038/gt,2008,16, ISSN 0969-7128, Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/gt200816>
 - 23 Borra's T, Recent developments in ocular gene therapy, *Exp Eye Res* 2003; 76: 643–652,
 - 24 Pleyer U, Ritter T, Gene therapy in immune-mediated diseases of the eye, *Prog Retin Eye Res* 2003; 22: 277–293
 - 25 Panyam J, Zhou WZ, Prabha S, Sahoo SK, Labhasetwar V, Rapid endolysosomal escape of poly (DL-lactide-coglycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery, *FASEB J* 2002; 16:1217-26, [PMID: 12153989]
 - 26 Contreras-Ruiz L, de la Fuente M, García-Vázquez C, Sáez V, Seijo B, Alonso MJ, Calonge M, Diebold Y, Ocular tolerance to a topical formulation of hyaluronic acid and chitosan-based nanoparticles, *Cornea* 2010; 29:550-8, [PMID: 20335805]
 - 27 De Campos A, Sa'nchez A, Gref R, Calvo P, Alonso MJ, The effect of a PEG vs a chitosan coating on the interaction of drug colloidal carriers with the ocular mucosa, *Eur J Pharm Sci* 2003; 20: 73–81
 - 28 Rabinovich-Guilatt L, Couvreur P, Lambert G, Dubenert C, Cationic vectors in ocular drug delivery, *J Drug Target* 2004; 12: 623–633

- 29 Zhu S-N, No"lle B, Duncker G, Expression of adhesion molecule CD44 in human corneas, *Br J Ophthalmol* 1997; 81: 80–84
- 30 Lerner LE, Schwartz DM, Hwang DG, Howes L, Stern R, Hyaluronan and CD44 in the human cornea and conjunctiva, *Exp Eye Res* 1998; 67: 481–484
- 31 Diebold Y, Jarrin M, Saez V, Carvalho EL, Orea M, Calonge M, Seijo B, Alonso MJ, Ocular drug delivery by liposomechitosan nanoparticle complexes (LCSNP), *Biomaterials* 2007; 28:1553-64, [PMID: 17169422]
- 32 Contreras-Ruiz, Laura et al, "Intracellular trafficking of hyaluronic acid-chitosan oligomer-based nanoparticles in cultured human ocular surface cells" *Molecular vision* vol, 17 279-90, 27 Jan, 2011
- 33 Příbalová informace: informace pro pacienta *OPHTHALMO-SEPTONEX oční kapky, roztok* [online], 2017, 3 [cit, 2018-12-03], Dostupné z: <https://www.lekarna.cz/ophthalmo-septonex-1x10ml-plast-ocni-kapky-roztok/pribalovy-letak/>
- 34 GRUNDĚLOVÁ, Lenka, Aleš MRÁČEK, Věra KAŠPÁRKOVÁ, Antonín MINAŘÍK a Petr SMOLKA, The influence of quarternary salt on hyaluronan conformation and particle size in solution, *Carbohydrate Polymers* [online], 2013, 98(1), 1039-1044 [cit, 2019-02-06], DOI: 10.1016/j.carbpol,2013,06,057, ISSN 01448617, Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014486171300653X>
- 35 Dynamický rozptyl světla, *Malvern Zetasizer Nano ZS* [online], Department of Condensed Matter Physics Faculty of Mathematics and Physics, Charles University [cit, 2016-04-20], Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/dls.htm>
- 36 Lékopis, Lékopis [online], [cit, 2015-05-14], Dostupné z: http://www.lekopis.cz/Kap_6_1_Carbethopendecinii_bromidum.htm
- 37 KALINA, Michal, Využití dynamického rozptylu světla k měření viskozity, In: *Chempoint: Vědci pro průmysl a praxi* [online], 2012 [cit, 2019-03-02], Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/vyuziti-dynamickeho-rozptylu-svetla-k-mereni-viskozity>
- 38 Lowry JA, Brown JT (June 2014), "Significance of the imidazoline receptors in toxicology", *Clinical Toxicology*, **52** (5): 454–69, doi:10.3109/15563650,2014,898770, PMID 24666288,
- 39 YANG, Qian, Yafang ZHANG, Xiuping LIU, Nan WANG, Zhenyu SONG a Kaili WU, A Comparison of the Effects of Benzalkonium Chloride on Ocular Surfaces between C57BL/6 and BALB/c Mice, *International Journal of Molecular Sciences* [online], 2017, **18**(3) [cit, 2019-03-24], DOI: 10.3390/ijms18030509, ISSN 1422-0067, Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/3/509>
- 40 Kyselina hyaluronová a oči, KYSELINA HYALURONOVÁ-MOLEKULA MLÁDÍ: Vše o kyselině hyaluronové [online], [cit, 2015-05-14], Dostupné z: <http://www.molekula-mladi.cz/kyselina-hyalurona-a-oci>
- 41 MANSURI, Shakir, Prashant KESHARWANI, Keerti JAIN, Rakesh K, TEKADE a N,K, JAIN, Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system, *Reactive and Functional Polymers*, 2016, **100**, 151-172, DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym,2016,01,011, ISSN 13815148, Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1381514816300104>
- 42 Zeta potenciál zeta, *Malvern Zetasizer Nano ZS* [online], Department of Condensed Matter Physics Faculty of Mathematics and Physics, Charles University [cit, 2016-04-25], Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/zeta.htm>

- 43 Zetasizer Nano ZS: Performance, simplicity, versatility, *Malvern Panalytical: a spectric company* [online], [cit, 2019-04-07], Dostupné z: <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs>
- 44 Závislost viskozity na procesních a molekulárních parametrech, *Učební texty Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně* [online], [cit, 2016-04-26], Dostupné z: http://ufmi.ft.utb.cz/texty/fyzika_pol/FP_03.pdf
- 45 Tokové chování polymerních tavenin – reologické modely, *Učební texty Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně* [online], [cit, 2016-04-26], Dostupné z: http://ufmi.ft.utb.cz/texty/fyzika_pol/FP_02.pdf
- 46 YU-JIN, Jin, Hyaluronic Acid in Drug Delivery Systems, *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2010, roč, 40, 33-43,
- 47 GUTER, Michaela a Miriam BREUNIG, Hyaluronan as a promising excipient for ocular drug delivery, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2017, **113**, 34-49, DOI: 10.1016/j.ejpb.2016.11.035, ISSN 09396411, Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641116303976>
- 48 SALZILLO, Rosanna, Chiara SCHIRALDI, Luisana CORSUTO, Antonella D'AGOSTINO, Rosanna FILOSA, Mario DE ROSA a Annalisa LA GATTA, Optimization of hyaluronan-based eye drop formulations, *Carbohydrate Polymers*, 2016, **153**, 275-283, DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.07.106, ISSN 01448617, Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861716309043>
- 49 Thalberg, K, Lindman, B: Interaction between hyaluronan and cationic surfactants, *Journal of Physical Chemistry*, 1989, vol, 93, pp 1478-1483,
- 50 GŘUNDĚLOVÁ, Lenka, Aleš MRÁČEK, Věra KAŠPÁRKOVÁ, Antonín MINAŘÍK a Petr SMOLKA, The influence of quarternary salt on hyaluronan conformation and particle size in solution, *Carbohydrate Polymers*, 2013, 98(1), 1039-1044, DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.06.057, ISSN 01448617, Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014486171300653X>
- 51 YUAN, Bo, Christos RITZOULIS a Jianshe CHEN. Rheological investigations of beta glucan functionality: Interactions with mucin. *Food Hydrocolloids* [online]. 2019, 87, 180-186 [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2018.07.049. ISSN 0268005X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X18310300>
- 52 ROSSI, S. Influence of mucin type on polymer-mucin rheological interactions. *Biomaterials* [online]. 1995, 16(14), 1073-1079 [cit. 2019-04-25]. DOI: 10.1016/0142-9612(95)98903-R. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/014296129598903R>
- 53 Contreras-Ruiz L, de la Fuente M, Párraga JE, et al. Intracellular trafficking of hyaluronic acid-chitosan oligomer-based nanoparticles in cultured human ocular surface cells. *Mol Vis*. 2011;17:279–290. Published 2011 Jan 27.
- 54 Struktur der Tetrazyolin-Enatiomere. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 11. Januar 2011 [cit. 2019-04-28]. Dostupné z: https://de.wikipedia.org/wiki/Tetrazyolin#/media/File:Tetrazyolin_enantiomeres.svg
- 55 Benzalkonium_chloride (general chemical structure). In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 19.

listopad 2013 [cit. 2019-04-28]. Dostupné z:
https://cs.wikipedia.org/wiki/Benzalkoniumchlorid#/media/File:Benzalkonium_chloride_Structure_V.1.svg

- 56 Přehledové schéma rohovky.: vertikální řez lidskou rohovkou. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 25. březen 2009 [cit. 2019-05-04]. Dostupné z:
https://cs.wikipedia.org/wiki/Rohovka#/media/File:Rez_lid_rohovkou.gif
- 57 IVARSSON, David a Marie WAHLGREN. Comparison of in vitro methods of measuring mucoadhesion: Ellipsometry, tensile strength and rheological measurements. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2012, **92**, 353-359 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.12.020. ISSN 09277765. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776511007600>

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Řez rohovkou [68]	8
Obrázek 2: Pohárková buňka [19].....	10
Obrázek 3: Schématické zobrazení typů membránově vázaných mucinů [20].....	11
Obrázek 4: Schéma sekrečního mucinu [20].....	12
Obrázek 5: Vzorec tetryzolin-hydrochlorid [2].....	14
Obrázek 6: Enantiomery tetryzolinu [54].....	14
Obrázek 7: Strukturní vzorek benzalkoniachloridu [55].....	15
Obrázek 8: Strukturní vzorec karbethopendeciniumbromidu	15
Obrázek 9: Metoda BIACORE [13].....	18
Obrázek 10: Schématický nákres endocytózy NP [22]	22
Obrázek 11: Závislost viskozity na smykové deformaci	31
Obrázek 12: Závislost viskozity na čase	31
Obrázek 13: Řada očních kapek Ophthalmo-Septonex (OPT) a VISINE (VIS) s rostoucím přídavkem hyaluronanu	40
Obrázek 14: Velikost částic nízkomolekulárního HyA.....	42
Obrázek 15: Velikost částic v systému tetryzolinu s přídavkem HyA.....	44
Obrázek 16: Velikost částic v systému benzalkonia chloridu s HyA	45
Obrázek 17: Velikost částic v systému očních kapek VISINE a HyA.....	47
Obrázek 18: Velikost částic v systému očních kapek Ophthalmo-Septonex a HyA	48
Obrázek 19: Velikost částic v roztoku hyaluronanu	50
Obrázek 20: Velikost částic v systému tetryzolinu s HyA.....	51
Obrázek 21: Velikost částic v systému benzalkonia chloridu s HyA	53
Obrázek 22: Velikost částic v systému očních kapek VISINE a HyA.....	55
Obrázek 23: Velikost částic systému očních kapek Ophthalmo-Septonex a HyA	56
Obrázek 24: Znázornění změny distribuce velikosti částic v systému OPT+HyA 80	58
Obrázek 25: Znázornění změny distribuce velikosti částic v systému VIS+HyA 80	59
Obrázek 26: Porovnání viskozity systému po přídavku hyaluronanem	60
Obrázek 27: Porovnání viskozit po přídavku hyaluronanu	60
Obrázek 28: Porovnání viskozit v systémech s hyaluronanem	61

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Mukoadhezivní polymery a testovací metody v závislosti na dávkování [3]	17
Tabulka 2: Sledování stability HyA+Visine	32
Tabulka 3: Sledování stability HyA+VISINE.....	33
Tabulka 4: Sledování stability HyA+oční kapky Septonex	33
Tabulka 5: Sledování systému nízkomolekulárního HyA s tetryzolinem	35
Tabulka 6: Sledování systému vysokomolekulárního HyA s tetryzolinem.....	36
Tabulka 7: Systémy s BAK a nízkomol. HyA	36
Tabulka 8: Systémy s BAK a vysokomol. HyA.....	37
Tabulka 9: Měření zeta potenciálu vzorků s přídavkem vysokomolekul. HyA v čase	38
Tabulka 10: Měření zeta potenciálu vzorků s přídavkem nízkomol. HyA v čase	39
Tabulka 11: Zeta potenciál systémů bez přídavku HyA	40
Tabulka 12: Měření velikosti částic boritého roztoku s HyA _a po dobu 8 dní	41
Tabulka 13: Měření velikosti částic roztoku tetryzolinu s HyA _a po dobu 8 dní	43
Tabulka 14: Měření velikosti částic roztoku BAK s HyA _a po dobu 8 dní	44
Tabulka 15: Měření velikosti částic kapek VISINE s HyA _a po dobu 8 dní	46
Tabulka 16: Měření velikosti částic kapek OPT s HyA _a po dobu 8 dní.....	47
Tabulka 17: Měření velikosti částic boritého roztoku s HyA _b po dobu 8 dní	49
Tabulka 18: Měření velikosti částic roztoku tetryzolinu s HyA _b po dobu 8 dní.....	50
Tabulka 19: Měření velikosti částic roztoku BAK s HyA _b po dobu 8 dní.....	52
Tabulka 20: Měření velikosti částic kapek VISINE s HyA _b po dobu 8 dní.....	54
Tabulka 21: Měření velikosti částic kapek OPT s HyA _b po dobu 8 dní	55
Tabulka 22: Dlouhodobé sledování zeta potenciálu vybraných systémů	57
Tabulka 23: Dlouhodobé sledování velikosti částic očních kapek Ophthalmo-Septonex s HyA	57
Tabulka 24: Dlouhodobé sledování velikosti částic očních kapek Visine s přídavkem 80μl/10ml	58
Tabulka 25: Výpočet mukoadhezivního indexu	62

SEZNAM ZKRATEK

HyA	Hyaluronan sodný
HyA _a	Nízkomolekulární HyA
HyA _b	Vysokomolekulární HyA
MUC	Mucin
OPT	Oční kapky Ophthalmo-Septonex
VIS	Oční kapky VISINE Classic
CS	Chitosan
CSO	Oligomery chitosanu
T	Týden
BAK	Benzalkonium chlorid